IMPERIAL BUREAU
19 DEC 1930
OF MYCOLOGY

Hadronotus brasiliensis,

NOVO SCELIONIDEO PARASITO DE OVOS DE UM COREIDEO.

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

Examinando posturas de hemipteros atacados por microhymenopteros, encontrei uma de coreideo cujos ovos haviam sido parasitados por um scelionideo do genero *Hadronotus* (sub-fam. Scelioninae). Parecendo-me tratar-se de especie ainda não estudada, descrevel-a-ei nas linhas que se seguem sob o nome:

Hadronotus brasiliensis n. sp.

Proximo de *H. rugosithorax* ASHM. e de *H. atriscapus* GAHAN, destinguindo-se de ambos, principalmente, pelo aspecto das antennas e do abdomen.

♀ — Compr., 2 mm. Robusto; cabeça um pouco mais larga que o thorax; occiput, em cima, apresentando 3 rugas tranversaes, de olho a olho, arqueadas no meio; no resto, excepto ao nivel da fosseta antennal, a superficie da cabeça é areolada ou escrobiculada, com um pequeno ponto no meio de cada depressão; um pouco acima dos ocellos lateraes, no limite posterior do vertex, uma carreira transversal de 4 areolas quadrangulares; escavação ou fosseta antennal distinctamente separada da fronte por uma prega arqueada, estriada transversalmente, dirigindo-se as estrias mais salientes da linha mediana ás areolas da face; olhos núS, ocellos lateraes numa depressão areolar; o espaço entre elles e o bordo do olho correspondente, igual ao diametro de um ocello; antennas (v. fig. 1); mesoscutum, scutellum, propodeum e metapleuras, areolados e ponteados como a cabeça; pro e mesopleuras transversalmente rugosas; do meio para traz do mesoscutum as areolas não são tão nitidas, elevando-se o tegumento em 6 rugas espessas longitudinaes, que se tornam mais evidentes para o bordo posterior; azas anteriores (v. fig. 3). Abdomen, approximadamente, da largura da cabeça; 1º tergito longitudinalmente enrugado, na base as rugas (10) são separadas por depressões mais profundas, para traz destas, no meio de cada espaço entre as rugas, corre parallelamente uma outra, mais fina; 2º tergito, de largura approximadamente igual a duas vezes o comprimento, tambem longitudinalmente enrugado, formando as rugas centraes uma area reticulada; 3º tergito, cerca de metade comprimento do segundo, igualmenta enrugado, porem de estrias mais finas; 4º cerca da metade do comprimento do 3º, apenas algumas estrias aos lados, ainda mais finas, que mal se percebem aos lados do 5º. Entre as rugas longitudinaes, o tegumento é finamente enrugado no sentido transverso. Esternitos ponteados. Todo o corpo provido de cerdas curtas e pallidas.

♂ — Semelhante á femea, excepto as antennas, que não são clavadas (v. fig. 2), e o abdomen, que apresenta um pequeno espinho nos an-

gulos lateraes posteriores do 3º, 4º e 5º tergitos e 2 espinhos caudaes, bem mais longos, aos lados do 6º tergito, de comprimento igual a distancia entre o bordo anterior e o posterior do 4º tergito.

Hab.: Fonseca, Nictheroy (E. do Rio).

Cotypos: nos vidros: 706 do Gabinete de Entomologia da Escola Superior de Agricultura e Medicina Veterinaria, 191 e 192 da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

Manguinhos, 18. V. 1928.

Fig. 1—Antenna da ♀ de *Hadronotus brasiliensis*.

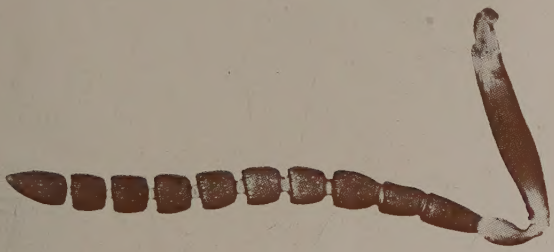


Fig. 2—Antenna do ♂ de *Hadronotus brasiliensis*.

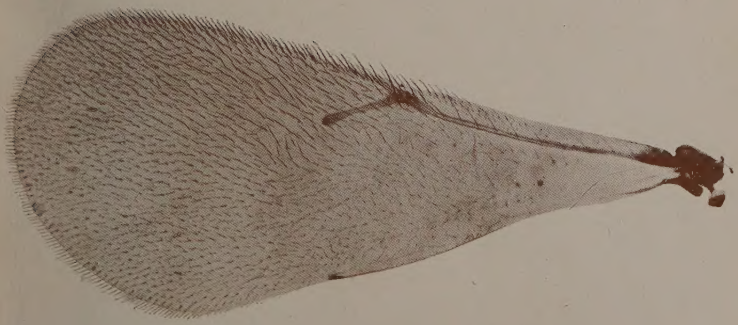


Fig. 3—Aza anterior de *Hadronotus brasiliensis*.

Reacção nuclear de Feulgen nos protozoarios.

CINETONUCLEO E APPARELHO PARABASAL.

Pelos Drs. A. MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ.

A presente nota representa o resultado das pesquizas que emprehendemos com o fim de esclarecer certos problemas, concernentes á morphologia dos protozoarios, empregando o methodo de coloração electiva da chromatina proposto por FEULGEN e que tão bons resultados vem dando nas mãos de outros pesquizadores.

Em 1911, JANICKI descreveu nos flagellados dos generos *Devescovina*, *Foaina*, etc., bem como na *Trichomonas batrachorum*, a presença de uma organella corando-se pela hematoxylina ferrea, ligada aos flagellos e á qual deu o nome de *parabasal*.

Essa formação, que apparece principalmente nos preparados fixados pelo acido osmico, foi depois assignalada por outros autores em diversas especies de *Trichomonas*.

Mais tarde o proprio JANICKI extendeu a denominação de *parabasal* a organellas encontradas em outros protozoarios e até então interpretadas de maneira differente. Esse modo de vêr foi adoptado por outros autores taes como WENYON, KOFOID e SWEZY, ALEXEIEFF, GRASSÉ etc. Na opinião desses autores devem ser considerados como parabasaes o cinetonucleo dos binucleados e os corpusculos chromophilos encontrados nos flagellados dos generos *Prowazekella* e *Giardia*.

Em nossas pesquizas procurámos verificar como se apresentam essas organellas em preparações tratadas pelo methodo de FEULGEN.

Empregámos em nossas pesquizas os seguintes flagellados: *Trichomonas batrachorum* de *Leptodactylus ocellatus*; *Trichomonas muris* de *Mus musculus* forma *albina*; *Prowasekella lacertae* de *Ameiva surinamensis*; *Giardia duodenalis* de *Lepus cuniculi* (formas vegetativas) e *Giardia intestinalis* de fézes humanas (kystos) e *Herptomonas cullicidarum* conservadas em culturas.

Para fixação empregamos o sublimado-alcool de SCHAUDINN e o acido osmico sob a forma de vapores. Este ultimo fixador foi o empregado nos preparados de *Trichomonas* com o fim de melhor pôr em evidencia o apparelho parabasal, cuja presença foi verificada em preparados corados pela Hematoxylina-ferrea de HEIDENHAIN.

Em todos os preparados tratados pelo methodo de FEULGEN os nucleos se apresentaram nitidamente corados em rôxo e o resto da preparação incolor.

Na *Herptomonas*, como era de prever em vista dos resultados obtidos por outros autores, o cinetonucleo se apresentava intensamente corado em rôxo. Ao contrario disso, nos demais flagellados além do nucleo nada mais se apresentava corado.

Dos resultados expostos acima se vê que as organellas que muitos autores julgam homologas e reunem sob a denominação de *parabasal* se comportam em relação ao methodo de FEULGEN, para coloração da chromatina, de maneira differente.

Assim, o cinetonucleo dos binucleados se cora intensamente por esse processo, o que mostra ser elle constituido de chromatina, embora não se possa concluir dahi que represente um segundo nucleo. Já nos outros flagellados as organellas consideradas como parabasaes não se coram pelo mesmo methodo e não são, pois, constituidas de chromatina.

Julgamos assim que se não póde considerar identicas e reunir sob a mesma denominação, organellas que se comportam de maneira completamente diversa em relação ao methodo empregado, cujo valor para caracterisação da chromatina é reconhecido por todos. Deve-se pois reservar a denominação de *parabasal* para as organellas encontradas nos protozoarios onde foram primitivamente assignaladas por JANICKI, reservando para o cinetonucleo dos binucleados essa ou outra denominação que não implique em identifical-o a orgãos de natureza differente.

Estudos sobre a Lepra

I. Transmissão da lepra humana ao camondongo branco (*) (Nota prévia com 7 figuras).

Pelo Dr. H. C. de SOUZA-ARAUJO.

Revendo a bibliographia sobre a transmissão experimental da lepra humana e da lepra murina, nos animaes de laboratorio, verifiquei a frequente confusão entre "infecção hanseniana" e "producção da lepra", que não são synonymas, parecendo-me que ninguem havia conseguido a transmissão da "lepra humana" ao camondongo branco.

LITTERATURA

Em 1902 T. SUGAI (1) inoculou material de lepra humana em camondongos dançadores do Japão, e obteve, em cerca de 20, uma infecção seguida de infiltração lepromatosa das visceras, contendo numerosos bacillos. O auctor refere que a morte desses animaes se deu entre o 19º e o 104º dias da inoculação, sem descrever lesões cutaneas.

CHARLES W. DUVAL (2) tambem conseguiu infectar essa variedade de camondongo, quer com a sua cultura de bacillo da lepra, quer com emulsão de lepromas. O periodo de incubação foi de 4 a 6 semanas. DUVAL assevera ter reproduzido a "doença no camondongo dançador do Japão", animal que considera elemento de prova, mas tambem não descreve lesões cutaneas. Quanto ao *camondongo branco*, ratos brancos e pardos, etc., as suas reiteradas tentativas de infecção foram infructiferas.

W. J. KEDROWSKY (3) usando a sua cultura dita do bacillo da lepra, após passagem em cobayo, conseguiu infectar tres camondongos brancos. Perante a Terceira Conferencia Internacional da Lepra (1923) KODROWSKY affirmou, vagamente, baseado nesse primitivo ensaio de 1903 ou 1904, suspenso por motivo da guerra Russo-Japoneza, ter conseguido inocular a lepra em coelhos e camondongos (J'ai réussi a inoculer la lèpre aux lapins et aux souris, p. 32, Rapport). Para esse pesquizador a melhor via para infectar ratos e camondongos é a mucosa ocular.

Verificaram MARCHOUX e SOREL (4) que o camondongo branco *póde ser* infectado com a lepra murina, sem haver generalização dos bacillos, que se observa nos ratos.

Com material do cadaver de um homem que morrera com lepra murina, apresentando nas visceras bacillos granulosos, conseguiu MARCHOUX (5) infectar 5 de 6 ratos brancos inoculados. Provou assim MARCHOUX que os bacillos granulosos não são "cadaveres" como querem alguns leprologos e que a lepra murina póde, accidentalmente, atacar o homem, mas não conseguiu nunca transmittir a lepra humana a ratos ou camondongos.

(*) Communicação feita á Academia Nacional de Medicina, em 2—VIII—1928.

Impressionado com esse caso MARCHOUX (6) fez, em 1925, innumeras pesquizas, inoculando com material fresco de lepra humana ratos brancos e cobayos, com o fim de provar a unicidade dos bacillos da lepra, sem chegar a qualquer resultado.

K. HARADA (7) usando a sua cultura do bacillo da lepra me disse ter produzido a infecção em ratos, seguida de morte até o 30º dia. Não sei, porém, que especie de rato elle empregou nas suas experiencias.

MUIR, HANDERSON e LANDEMAN (8) obtiveram a infecção experimental de 97,7 º/o dos ratos brancos e decumanos inoculados com *Bacillus leprae murium*, com formação de tumores abdominaes, entretanto MUIR e HANDERSON (9) só obtiveram resultados negativos inoculando material de lepra humana em camondongos dançadores do Japão, ratos brancos e rato selvagem da China (Chinese hamster, *Cricetulus griseus*).

ANGELO H. ROFFO (10) não teve melhor sorte inoculando, em 1927, 100 ratos com emulsões de lepromas, de varios doentes, ricas em bacillos. Esta revisão da litteratura sobre o assumpto é necessaria para salientar pontos das minhas experiencias.

MINHAS EXPERIENCIAS

Com emulsão dum leproma extrahido do dorso da mão do Dr. J. P. A. (de Minas Geraes), (v. figs. 1 e 2), rica em bacillos, inoculei, no dia 6 de Junho findo:

1) Um macaco Pseudo-cebus, com
   1 c.c. por via subcutanea na região malar direita, e
   1 c.c. por via intraperitoneal.
2) Um rato branco, com
   1 c.c. por via intraperitoneal.
3) Dous camondongos brancos, com
   1/2 c.c. por via intraperitoneal, em cada um.

Resultado, 23 dias depois (29/6/928):

a) O macaco apresenta um nodulo na face. Este mesmo macaco tinha sido inoculado com emulsão de leproma de outro doente, em 3 de Fevereiro passado, na face e no peritoneo, e a 18 de Março apresentava dous pequenos nodulos na fronte, que desappareceram um mez depois. A primeira infecção tornou-se patente em 45 dias e a segunda em 23.

b) O rato branco nada apresenta de anormal.

c) Dos 2 camondongos 1 morreu no dia seguinte á inoculação e o outro apresentava, no 23º dia, uma fistula entre as ultimas costellas direitas. O liquido colhido ahi, com uma alça de platina, após desinfecção da região, era riquissimo em bacillos acido-resistentes e globias (v. fig. 3). Sacrificado o animal, que se achava bastante doente, encontrei um tumor abdominal, de um centimetro de comprimento por meio de largo, adherente ao baço-interessando o peritoneo e a musculatura lombar. Os esfregaços desse tumor, dos ganglios abdominaes, do baço e do figado revelaram muitos bacillos acido-alcool-resistentes, a maioria em feixes e tambem sob a forma de globias. Macroscopicamente o figado parecia normal, entretanto era o orgão mais infectado. Os cortes do tumor—que é de constituição lymphoide—, do

baço e dos rins, feitos gentilmente pelo Dr. BURLE DE FIGUEIREDO revelaram, ao meu exame, sobretudo os dous primeiros, abundantes bacillos acido-resistentes, em feixes, de aspecto normal.

Temos aqui um caso de "infecção hanseniana" generalizada. A presença de globias (massas zoogleicas especificas da lepra humana) no figado, baço e ganglios indica a multiplicação do bacillo in situ, *segundo affirma Wade e prova não se tratar de lepra murina.*

Com emulsão de visceras deste animal inoculei 3 camondongos, 1 cobayo e 1 rato branco. Dous dos primeiros morreram accidentalmente e 1 está bem, assim como o cobayo.

O rato apresentava, 18 dias depois, um nodulo subcutaneo abdominal, que cresceu até o tamanho duma azeitona. No 24º dia resolvi extirpar este tuberculo para passagens e encontrei-o caseificado. Os esfregaços do pús e da raspagem da musculatura abdominal mostraram alguns bacillos acido-alcool-resistentes, segmentados, com aspecto de franca degeneração, e uma grande globia, com bacillos granulosos.

***

No dia 3 de Julho corrente extirpei, sem pelle, mais 2 lepromas do mesmo doente Dr. J. P. A. Preparada a emulsão delles, que era rica em bacillos, repeti as semeaduras em varios meios, e inoculei 9 camondongos brancos e 1 cobayo, por via intraperitoneal. Nos camondongos injectei 1/2 c.c. e no cobayo 1 c.c. No dia 17 um dos camondongos apresentava um nodulo dermico no dorso e outro na paleta direita, ambos do tamanho duma ervilha, e um menor no abdomen. Havia completa alopecia sobre os dous primeiros elementos (V. photo nº. 6).

No dia 20 apresentando esses nodulos franca tendencia a regredir, resolvi extirpar o dorsal para fazer passagens e encontrei-o caseificado. O exame rapido do pús não revelou bacillos. Sacrificado o animal encontrei apenas o figado e o baço congestos e augmentados de volume. Os esfregaços do figado, do baço e dos rins mostraram alguns bacillos acido-alcool-resistentes, dispostos em grupos de 2 a 4, segmentados ou granulosos, denotando adeantada degeneração.

A producção de nodulos dermicos, semelhantes a lepromas, acompanhados de completa alopecia in loco, *leva-me a considerar este caso como de transmissão da lepra humana ao camondongo branco.*

***

No dia 5 do corrente extirpei, sem pelle, 2 lepromas floridos da Senhorinha H. S. (de Minas Geraes). Com a emulsão de um delles inoculei, por via intraperitoneal, 6 camondongos brancos. Dose individual 1/2 c.c. Deixei o outro leproma no alcool absoluto durante 36 horas, quando o triturei e emulsionei, inoculando outros 3 camondongos (testemunhas), empregando as mesmas dose e via usadas na primeira serie. A emulsão do leproma tratado pelo alcool era tambem rica em bacillos de aspecto morphologico identico ao do material fresco. A 27 amanheceu morto um dos 6 primeiros camondongos. A sua necropsia revelou: pelle integra; figado e pulmões cobertos de microabcessos (aspecto de granulia); as outras visceras com apparencia normal (v. fig. 7). Os esfregaços dos pulmões, figado,

baço, ganglios abdominaes, rins e testiculo revelaram bacillos acido-alcool-resistentes isolados e em feixes. Os rins apresentavam massas de bacillos. Os esfregaços dos micro-abcessos mostraram verdadeiras massas de bacillos acido-alcool-resistentes e campos microscopicos com 3 a 5 globias (V. fig. 4).

Resolvi conservar a peça integra para o museo do Instituto.

Re-examinando hoje todos os demais animaes inoculados, cerca de 30, não encontrei nenhum enfermo.

CONCLUSÕES

1) A inoculação de emulsão de leproma em camondongo branco, por via intraperitoneal, produz ora uma simples infecção generalizada, seguida de morte entre 3 a 4 semanas, ora infecção acompanhada de tumor, de micro-abcessos ou de nodulos dermicos.

2) A presença de globias no tumor, nos micro-abcessos, nodulos e visceras indica franca multiplicação do bacillo de Hansen nesse animal.

3) A passagem da infecção do camondongo branco ao rato branco foi positiva.

4) A verificação da sensibilidade do camondongo branco á infecção hanseniana veio abrir novo campo de experimentação para o estudo da etiopathogenia da lepra.

Manguinhos, 31 de Julho de 1928.

BIBLIOGRAPHIA

1) Sugai, T.,—Gelungen Uebertragungsversuche mit lepra bei Säugetieren. LEPRA, Vol. 8, Fasc. 3, P. 157, 1909.

2) Duval, Charles W.,—The cultivation of leprosy bacillus and the experimental production of leprosy in the Japanese dancing mouse. Jour. Experim. med. Vol. 12, p. 649, New York 1910.

3) Kedrowsky, W. J.,—Experimentalle Untersuchungen ueber Lepra-impfungen bei Tieren. Zeitsch. f. Hygiene und Infektkrank., Vol. 66, pp. 1—97, 1910, e p. 32 IIIe Conf. Intern. de la lèqre (1923) Rapport. Paris 1924.

4) Marchoux et Sorel.—Lepra, tomo XIII, p. 171, 1913. La lèpre des rats.

5) Marchoux, E.,—La lèpre du rat et sa transmission probadle a l'Homme. IIIe. Conférence Internationale de la Lèpre. Rapport, p. 109, Paris, 1924.

6) Marchoux, E.,—Unicité ou pluralité des bacilles lépreux. Bull. Acad. Med. Vol. 94, N. 39, p. 1091, 1925.

7) Karada, K., *in* Cultura do bacillo da lepra (H. C. de Souza-Araujo). Brazil Medico, de 5 de Março de 1927.

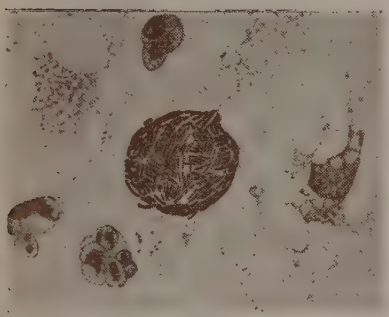
8) Muir, Henderson and Landeman.,—Tumor-like growths caused by intraperitoneal inoculation of *B. leprae murium*. Ind. Jour. med. Res., Vol. XV, p. 15, 1927.

9) Muir, E. and Henderson, J. M.,—Rat Leprosy etc. Indian jour. med. Res. V. XV, N. 3, p. 807, 1928.

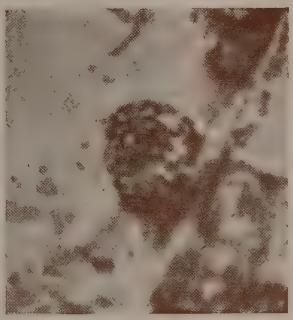
10) Roffo, A. H.,—Sobre la transmission de la lepra a los monos inferiores. Bol. Inst. Medicina Experim., N. 15, Jan. 1927. B. Aires.

1

2



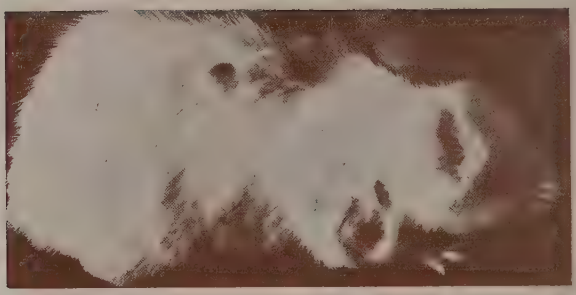
3



4

5

Fig. 1 – J. P. A., leproso ha 26 annos, que forneceu material para a infecção de macaco, camondongos e rato branco (passagem).
Fig. 2 Desenho do esfregaço da emulsão de leproma inoculada. Immersão 1/12 e Ocular 15.
Fig. 3 Globia. Desenho do esfregaço de secreção da fistula do 1º camondongo infectado. Grande augmento.
Fig. 4 – Photomicrographia de esfregaço de pulmão do 3º camondongo infectado (micro-abcesso). Globia. Grande augmento.
Fig. 5 Globias. Photomicrographia de esfregaço de micro-abcesso do 3º camondongo infectado.

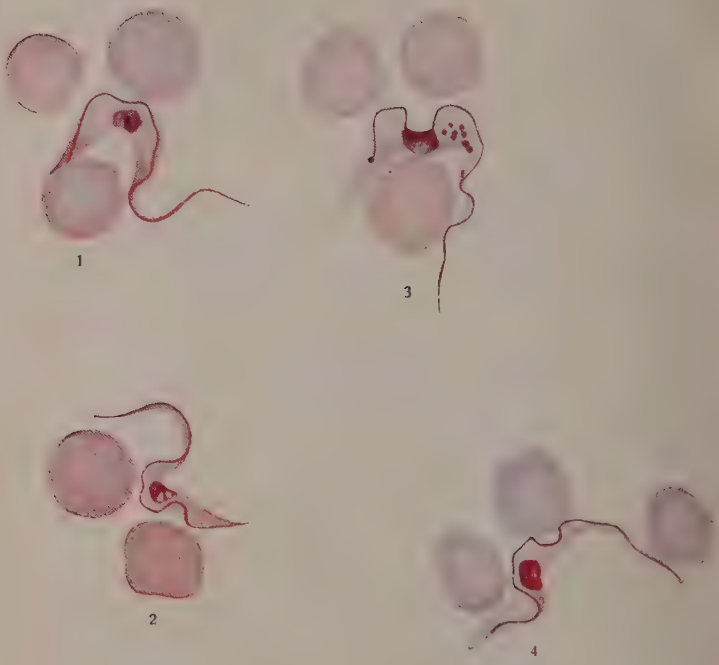


6

7

Fig. 6—2o. Camondongo infectado com material do doente J. P. A. Nodulos no dorso, palleta direita e abdomen. Bacillos acido-alcool-resistentes nas visceras.

Fig. 7 - 3o. Camondongo infectado com lepra humana. Os micro-abcessos dos pulmões e do figado eram ricos em globias.



Influencia do pH sobre as colorações pelo methodo de GIEMSA.

1—Coloração feita com dissolvente de pH 6,8
2—Coloração feita com dissolvente de pH 7,0
3—Coloração feita com dissolvente de pH 7,4
4—Coloração feita com dissolvente de pH 7,6

Influencia do pH sobre as colorações

PELO METHODO DE GIEMSA

Pelo Dr. JOSÉ GUILHERME LACORTE.

(Com 1 figura em cores).

Observando que as colorações, pelo methodo de Giemsa, de esfregaços de sangue para exame de trypanosomos não eram uniformes com o emprego de corante do mesmo vidro, resolvemos verificar a influencia do pH da agua usada para a diluição do referido corante.

Realisámos da seguinte maneira a experiencia:

Diluição do corante na proporção de uma gotta por centimetro cubico de dissolvente. Este foi a agua distillada accrescida de phosphato acido de sodio e soda, de maneira a variar o pH de 6,6 até 7,8.

Tempo de coloração: 1/2 hora, 1 hora, 2 horas, e 24 horas.

Conferimos a exactidão do pH, antes de fazer as soluções corantes, pelo processo colorimetrico.

Usámos esfregaços de sangue de cobaya infectada experimentalmente com *Trypanosoma gambiense*.

A coloração optima foi obtida com a solução de pH 7,4, agindo sobre os esfregaços durante 1 hora.

Com os solutos de pH 6,6—6,8 —7,0—7,2 o material toma, de preferencia, a coloração avermelhada, que é tanto mais intensa quanto mais baixo o pH. Alem disso, ha pouca differenciação na morphologia do flagellado. Com os solutos de pH 7,6 e 7,8 houve, pelo contrario, tendencia á coloração azul. Finalmente, com o de pH 7,4 a coloração foi optima, tanto pela differenciação como pela coloração de aspectos morphologicos, que não appareceram nos outros esfregaços, como sejam as granulações de volutina e do blepharoblasto, que se apresenta muito nítido.

As hematias tambem seguem progressivamente do vermelho para o azul.

Devemos referir que as substancias addicionadas á agua para variar o pH em nada alteraram a solução do corante que não deu precipitado nem formou deposito sobre a lamina.

Portanto nas nossas colorações pelo methodo de Giemsa o optimo do pH do dissolvente, para colorir esfregaços do sangue de cobaya, experimentalmente infectada com *Trypanosoma gambiense*, foi de 7,4, corados durante 1 hora.

A questão das esplenomegalias mycosicas

Pelos Drs. OLYMPIO DA FONSECA, filho e A. E. de ARÉA LEÃO.

As lesões primeiro descriptas em 1905 por GANDY e, depois, detalhadamente estudadas por outros, entre os quaes D. SYMMERS, A. O. GETTLER e W. M. JOHNSTON em 1919 e CARLO GAMNA em 1924, foram ultimamente objecto das pesquisas de varios investigadores que se esforçaram por demonstrar sua natureza parasitaria.

Em 1926, NANTA, PINOY e GRUNY apresentaram á Sociedade de Biologia, em Paris, uma nota sobre uma série de casos de esplenomegalia operados na Algeria por COSTANTINI, em que o baço mostrava uma transformação granulomatosa e nodulos esclerosicos e siderosicos, adherentes, duros, disseminados, de côr ferruginosa, medindo 1 a 2 millimetros de diametro e encerrando cellulas gigantes de typo das de corpo extranho. O que, porêm, ahi chamava mais a attenção era a presença de longas faixas, de 5 a 15 micra de diametro, rectilineas ou onduladas, ás vezes refringentes e não coraveis, ás vezes *coradas como si fossem feixes conjunctivos em degeneração basophila*. Nessas lesões os autores encontraram germens que não puderam cultivar e que eram um espirocheta de espiraes frouxas e pouco numerosas e um estreptobacillo, só observado nos nodulos e constituindo kystos comparaveis aos das myxobacterias. A essa communicação inicial seguiram-se as notas apresentadas á Academia de Sciencias de Paris, respectivamente por NANTA e PINOY, sobre uma esplenomegalia myxobacteriana e sobre uma synbacteria isolada de casos de esplenomegalia. Já ahi são postos á margem os espirochetas como de presença inconstante e é descripto o *Synbacterium splenomegaliæ* como formando kystos constituidos ás vezes á custa das fibras de collageno, as quaes tambem podem formar faixas ornadas de clavas e espinhos analogos aos encontrados por MAGROU nos grãos da botryomycose estaphylococcica experimental. O germen que é agora descripto como um cocco ou um diplococco encapsulado, mata o coelho e o cobaio em menos de 24 horas, produzindo congestão do baço e das suprarenaes. No cobaio, por via subcutanea, obtem-se no ponto de inoculação um edema gelatinoso em que se encontram os germens encapsulados e, ás vezes, longas fórmas filamentosas. O sangue dos animaes inoculados não coagula e mostra uma diminuição do numero de leucocytos. Estes podem se mostrar alterados e encerrando frequentemente coccos e diplobacillos. O papel dessa synbacteria na producção dos casos de esplenomegalia em que foi observada não é então considerado provado, mas presume PINOY que ella deva produzir uma molestia aguda, febril cujo estado chronico corresponderia á condição de esplenomegalia estudada.

Em principios de 1927, as idéas de PINOY e NANTA evoluiram já e numa nota apresentada á Academia de Sciencias de Paris, esses autores pela primeira vez attribuem á acção pathogenica de um cogumelo do grupo do *Aspergillus nidulans* os casos de esplenomegalia que até então tinham estudado. Os pseudo-kystos attribuidos a principio á synbacteria re-

presentariam ora os orgãos de fructificação, ora orgãos ornamentaes do perithecio: *o nodulo de Gamna*, dizem elles, *é um nodulo mycosico e as esplenomegalias com nodulos de Gamna são mycetomas do baço.* As bacterías que foram encontradas provavelmente são apenas acarretadas, introduzidas pelo cogumelo, como simples germens de infecção secundaria. Nessa mesma nota PINOY e NANTA suggerem a possibilidade de terem as esplenomegalias egypcias a mesma etiologia mycosica e insistem sobre a frequencia na Algeria dessas mycoses do baço. Em uma nota apresentada ao *Congrès pour l'avancement des Sciences*, em Constantina, em principios de 1927, PINOY propõe para o cogumelo isolado dos baços que estudára a creação de uma nova especie que denomina *Aspergillus nantæ* e que se distinguiria do *Aspergillus nidulans*, entre outros caracteres, pela ausencia de perithecios nas culturas.

Pouco tempo depois, P. ÉMILE-WEIL, GRÉGOIRE e FLANDRIN apresentam á Sociedade Medica dos Hospitaes de Paris sete casos parisienses de esplenomegalia mycosica primitiva dentre dezeseis baços retirados cirurgicamente ou em autopsia. Os autores insistem nas dificuldades do diagnostico clinico e accentuam a interpretação das lesões esplenicas como devidas á infecção por um cogumelo. Descrevem os nodulos de GAMNA como cercados de cellulas gigantes que englobam esporos, fragmentos mycelianos e granulações de um pigmento que toma coloração azul pelo ferrocyaneto de potasio. Os nodulos estariam cheios de filamentos mycelianos que, entretanto, se apresentariam nada ou pouco corados pelos azues. Cabeças aspergillares são tambem encontradas por P. É.-WEIL, GRÉGOIRE e FLANDRIN que ainda assignalam a extensa invasão pelo mycelio das paredes vasculares. Tambem grandes esporos encapsulados com um ou mais envoltorios foram assignalados nesses casos parisienses como o tinham sido nos algerianos por NANTA e PINOY. P. É.-WEIL, GREGOIRE e FLANDRIN consideram que o aspecto do cogumelo é tão caracteristico e constante que sua existencia não poderia ser contestada mesmo no caso de falharem as provas culturaes. Os tres autores citados, conseguiram em dois casos isolar dos baços estudados um cogumelo differente do de NANTA e PINOY, concluindo dahi que as esplenomegalias mycosicas podem ser produzidas por diversas especies do aspergillos.

Em Paris P. ÉMILE-WEIL, GRÉGOIRE e FLANDRIN, portanto, como logo depois ASKANAZY e SCHWEIZER, confirmam e ampliam as conclusões de NANTA e PINOY. Estes, por sua vez, se vêm a apoiar em uma experiencia que segundo elles mostra a virulencia das culturas do cogumelo que é capaz de, por via venosa, matar em 8 dias um coelho nelle determinando lesões comparaveis as produzidas pelo *Aspergillus fumigatus* e comparaveis tambem até certo ponto, embora muito mais agudas, com as observadas nos casos de esplenomegalia humana.

Outros casos de SABRAZÈS e MURATET, BÉCART, CÔYON, WILLEMIN CLOY e BRUN, ARSEN PRODANOS vinham sendo publicados e apresentados em apoio das mesmas idéas da natureza mycosica de certas esplenomegalias. A grande autoridade de alguns dos pesquisadores que traziam todas essas contribuições, particularmente a reconhecida competencia de PINOY que é um dos vultos mais notaveis entre os que se occupam de mycologia medica, parecia cercar todas essas observações de garantias taes de exactidão que se passou a considerar certa e indubitavel a existen-

cia das mycoses do baço e de sua intervenção na producção de esplenomegalias do typo das observadas na molestia de BANTI e outras entidades morbidas.

Não tardou muito, porêm, que restricções se fossem fazendo no que diz respeito á relação que existiria entre a infecção mycosica e os signaes morbidos observados. OBERLING, em principios do corrente anno, encontrou os nodulos siderosicos em um caso de leucemia lymphatica e os considerou constantes nos casos de molestia de BANTI, os nodulos typicos, cuja natureza mycosica não põe em duvida, tendo sido demonstrados em abundancia até mesmo em material de um dos casos estudados pelo proprio BANTI e conservado no Instituto de Anatomia Pathologica de Strasburgo. A presença de lesões consideradas mycosicas em grande numero de casos de affecções diversas, levou OBERLING a duvidar que se tratasse de infecção primitiva e a admittir que essas lesões representassem implantação secundaria de cogumelos em lesão preexistente de natureza variavel.

A. GOSSET, S. BERTRAND e J. MAGROU, inoculando suspensão de esporos do *Aspergillus nantæ* na polpa esplenica e na atmosphera gordurosa do rim de um coelho, obtêm no fim de 43 dias uma esplenomegalia, acompanhada de ascite e de pseudo-tuberculose pulmonar. A pesquisa de filamentos mycelianos nos córtes do animal inoculado foi negativa, só se encontrando elementos de natureza duvidosa, talvez fragmentos degenerados do cogumelo injectado. Os autores pensam na possibilidade de uma fórma filtravel do aspergillo. Mais logico e natural é suppôr que a esplenomegalia e as outras lesões observadas não representassem consequencia de infecção pelo cogumelo e sim resultados tardios do traumatismo ou da introducção de corpos ou substancias extranhas na propria massa do parenchyma esplenico.

A primeira voz nitidamente discordante do côro de confirmações dos trabalhos de NANTA e de PINOY, partiu justamente de CARLO GAMNA, um dos observadores que primeiro estudaram as lesões nodulares siderosicas do baço. GAMNA, refere que observou os nodulos por elle descriptos em casos de molestia de BANTI, cirrhose atrophica esplenomegalica, ictericia hemolytica constitucional, de molestia de STILL, emquanto OBERLING os encontrara ainda em casos de cirrhose pigmentar, de cirrhose atrophica de LAENNEC, cirrhose calculosa, etc. Aliás, CHRISTELLER e PUSKEPPELIES, EPPINGER, KLINGE e HENNINGS, SIEGMUND, WOHLWILL, SCHUPPISSER, KRAUS, KLINGE, NICOD, DAY e JERGUSSON tinham verificado analogas lesões em fórmas diversas de esplenomegalias chronicas, sem nellas verem ou referirem qualquer vestigio de formações mycelianas.

GAMNA lembra que as formações filamentosas e siderosicas constituintes do pseudomycelio encontrado nos nodulos do baço são conhecidas dos histologistas como resultado de transformações regressivas de elementos dos tecidos e que sómente sua presença não basta para se admittir a possibilidade de um caso sem precedente na historia da mycologia medica, de infecção primitiva e circumscripta por um cogumelo de um orgão profundo como o baço.

Logo depois de GAMNA, LANGERON faz uma critica detalhada das observações e conclusões de PINOY e seus collaboradores. Mostra

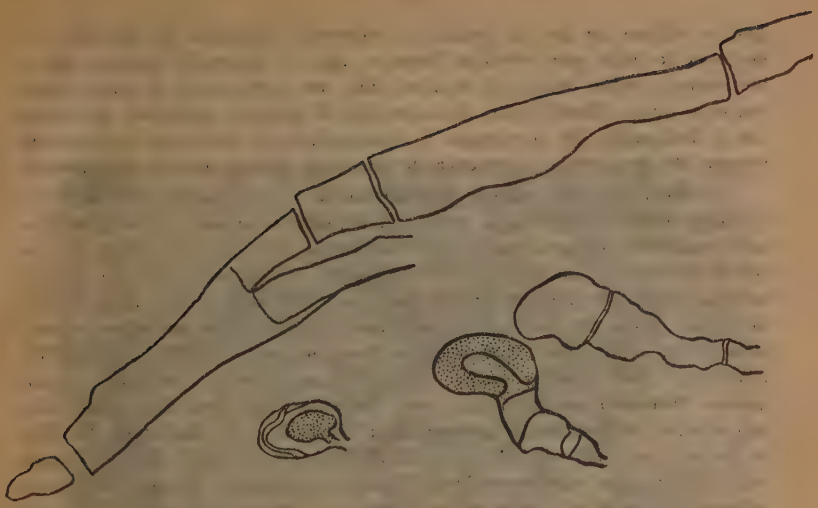


Fig. 1—Em cima, fórmas filamentosas, septadas e ramificadas que se vêm nos nodulos de GANDY — GAMNA. Em baixo, á esquerda, fórmas interpretadas por PINOY e NANTA, como *perolas* e espóros de *Aspergillus nantae*. Autopsia 1.372, do Instituto Oswaldo Cruz.

Fig. 1—In the upper portion, filamentous, branched formations found in GANDY—GAMNA nodules. In the lower portion, forms interpreted as *Hüllezellen* and spores of *Aspergillus nantae*. Case 1.372, Instituto Oswaldo Cruz.

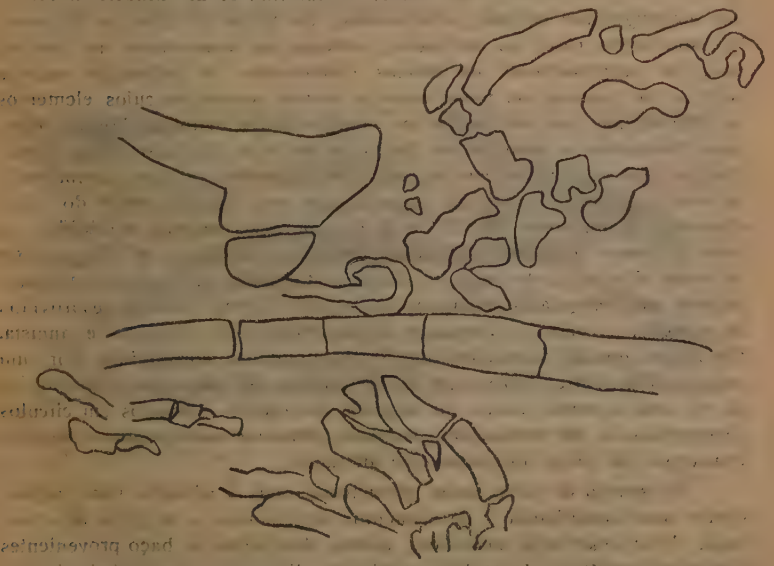


Fig. 2—Diversas fórmas filamentosas do pseudo-mycelio nos nodulos de GANDY—GAMNA. Autopsia 1.372, do Instituto Oswaldo Cruz.

Fig. 2—Several thread-like forms of the pseudo-mycelium in the GANDY—GAMNA nodules. Case 1.372, Instituto Oswaldo Cruz.

que as culturas de que foi isolado o cogumelo accusado de produzir as mycoses do baço eram culturas impuras, que o cogumelo mesmo não é incriminado senão depois de o terem sido um espirocheta e uma myxobacteria, que a identificação do aspergillo foi desde o principio hesitante, que a designação de mycetoma é incorrectamente applicada á supposta mycose do baço onde a presença de pus e de fistulas não é assignalada.

Estava já assim abalada profundamente a noção de mycose esplenica tal como PINOY, NANTA e seus collaboradores tinham tentado implantal-a quando resolvemos fazer uma revisão do material proveniente de casos de esplenomegalia e existentes na Secção de Anatomia Pathologica do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Verificámos então a existencia de muitos casos em que haviam sido assignaladas lesões nodulares siderosicas de typo inteiramente identico ao descripto por GANDY, SYMMERS, GAMNA e tantos outros autores. Alguns desses casos brazileiros haviam mesmo fornecido assumpto para uma these de doutoramento sahida dos laboratorios do Instituto e apresentada á Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro em 1923 pela Doutora HERMINIA DE SOUZA ASSIS. Desses casos, alguns não mostravam lesões muito accentuadas ou que muito se prestassem a confusão com lesões mycosicas. Outras havia, entretanto, em que a individualisação dos nodulos de GANDY-SYMMERS-GAMNA era muito accentuada, seu aspecto recordando realmente o de grãos de myce toma e, mais ainda, o dos grãos da botryomycose estaphylococcica.

Nos preparados corados pela hematoxylina e a eosina, encontram-se, ás vezes em grande numero, esparsas no tecido do orgão, com mais frequencia nas proximidades dos vasos, massas (fig. 3) de aspecto homogeneo e configuração variada, arredondadas, em fórma de faixa ou de novello, coradas em roseo na peripheria, incolores ou acinzentadas no centro, em geral acompanhadas de fórmas filamentosas de coloração analoga isoladas ou reunidas em feixes mais ou menos compactos cujos elementos se differenciam uns dos outros de maneira pouco distincta. Muitas vezes, esses filamentos se enrolam em torno de um vaso. Ao lado dessas formações coradas em roseo ou em cinzento claro e, embora anhistas, comparaveis ás vezes a grãos de mycetoma, encontram-se em outros pontos do córte elementos filamentosos (fig. 1, 2 e 4) de coloração amarella esverdeada ou mais ou menos intensamente azulada, rectilineos, sinuosos ou ennovellados ás vezes bifurcados, de diametro irregular, formados de segmentos grosseiramente quadrangulares separados por espaços claros lineares, desprovidos de qualquer envoltorio e formados de uma substancia compacta e anhista. Em alguns pontos, formações (fig. 5) arredondadas constituidas por um espaço claro central cercado de varias camadas de elementos filamentosos de côr azul, cinzenta escura ou amarella esverdeada, dispostos em circulos concentricos ou em ondulações parallelas, parecem corresponder a secções transversas de vasos profundamente alterados.

O aspecto de todas essas estructuras pode á primeira vista impressionar como semelhando o de elementos mycelianos e o de grãos de mycetoma. Uma observação minuciosa, porêm, dos córtes de baço provenientes dos casos brazileiros de esplenomegalia que tivemos opportunidade de examinar não permittiu verificar a presença de elemento algum que indiscutivelmente se pudesse attribuir a cogumelos. Muito ao contrario, todas as

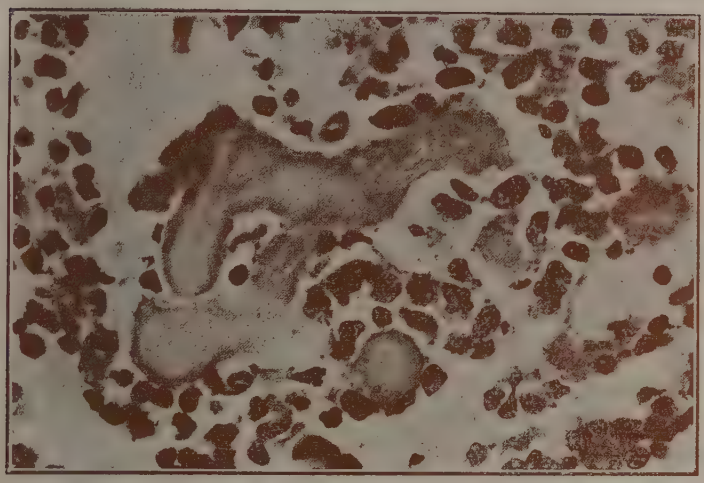


Fig. 3—Nodulo do baço simulando grão de mycetoma.
Fig. 3—Spleen nodule, simulating mycetoma grain.

Fig. 4—Fórma filamentosa, septada e ramificada do pseudo-mycelio.
Fig. 4—Thread-like form, branched and multi-locular of the pseudo-mycelium.

Phots. J. Pinto.

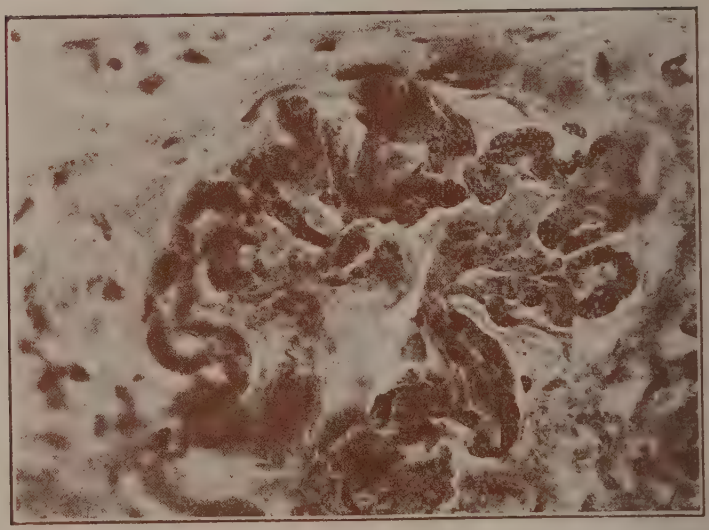


Fig. 5—Fórma simulando (?) perithecio.
Fig. 5 - A form simulating (?) perithecia Phot. J. Pinto.

formações verificadas mostravam transições para elementos outros que visivelmente não podiam ser considerados mycelianos e sim prendiam-se a alterações de tecidos que se observam em condições morbidas muito diversas. E' como tal que, de accordo com GAMNA e com LANGERON, interpretamos os aspectos observados nos nodulos siderosicos do baço nos casos brazileiros.

A proposito, referiremos a difficuldade muito grande que se encontra ás vezes para a correcta identificação de elementos de cogumelos nos tecidos. Ainda não ha muito procurou a Clinica Dermatologica da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro um doente, estudante de medicina, portador de duas grandes lesões ulcero-crostosas do antebraço que clinicamente foram consideradas como suspeitas de origem mycosica. Praticada a biopsia, os córtes mostraram muitas formações filamentosas ás vezes ramificadas e de aspecto gemmulante que pareciam confirmar as suspeitas clinicas. Nenhuma das formações filamentosas em questão se apresentava, entretanto, com aspecto indubitavel de mycelio e, como as provas culturaes não dessem resultados concludentes e dessas lesões abertas isolassemos apenas cogumelos banaes, foi sendo afastada aos poucos a hypothese de mycose. Melhor interrogado o doente, no fim de contas se veio saber que era um epileptico e estava ha muito sob a acção do especifico BARASCH que, como é sabido, tem por base o bromureto de potassio. Tratava-se de um caso de intoxicação por esse sal, um caso de bromide, que foi seguido de cura completa com a suppressão pura e simples da medicação intoxicante.

Esse caso nos foi muito instructivo e permittiu que adquirissemos uma experiencia que nos tem sido muito util na pesquisa dos cogumelos em córtes de tecidos animaes.

Estamos convencidos de que no caso das esplenomegalias em que se observam nodulos siderosicos são aspectos degenerativos todos aquelles que PINOY, NANTA e outros vêm ultimamente descrevendo como de um aspergillo pathogenico.

Agradecimentos aos nossos collegas, Drs. C. DE MAGARINOS TORRES e OSWINO PENNA, que puzeram a nossa disposição o material da secção de Anatomia Pathologica.

(Laboratorio de Mycologia do Instituto Oswaldo Cruz)

The question of mycotic splenomegaly

By Drs. OLYMPIO DA FONSECA filho and A. E. de ARÊA LEÃO.

The lesions first described in 1905 by GANDY and, afterwards, studied in detail by others, among which D. SYMMERS, A. O. GETTLER and W. M. JOHNSTON in 1919 and CARLO GAMNA in 1924, were lately the subject of researches by several investigators who attempted to demonstrate their parasitic nature.

In 1926, NANTA, PINOY and GRUNY presented to the Society of Biology, in Paris, a note on several cases of splenomegaly operated on at Algiers by CONSTANTINI, in which the spleen showed a granulatomous transformation and sclerotic and siderotic adhering hard nodules, disseminated, of a ferruginous color, measuring 1 to 2 mm. in diameter and containing giant cells of the type of those of foreign body. What, however, called most the attention was the presence of long bands, 5 to 15 micra in diameter, rectilinear or wavy, sometimes refringent and not staining, or, sometimes, *stained as if they were conjunctive bundles in basophile degeneration.* In these lesions the authors found germs which they could not cultivate and which were a spirochæte with a few loose spirals and a streptobacillus, only observed in the nodules and forming cysts comparable to those of the myxobacteria.

That initial communication was followed by the notes presented afterwards to the Academy of Sciences of Paris, respectively by NANTA and PINOY, on a myxobacterian splenomegaly and on a synbacterium isolated from cases of splenomegaly. Already there were being put apart the spirochaetes as non constant and *Synbacterium splenomegaliæ* is described as forming cysts sometimes with the loss of collagen fibres, which can also form bands adorned with clavae and spines analogous to those found by MAGROU in the grains of experimental staphylococcic botryomycosis. The germ which is now described as a coccus or as an encapsulated diplococcus, kills the rabit and the Guinea pig in less than 24 hours, producing congestion of the spleen and adrenals. In the Guinea pig, subcutaneously, a gelatinous oedema in which are found the encapsulated germs and, sometimes, long filamentous forms, is obtained at the place of the inoculation.

The blood of the inoculated animals does not coagulate and shows a decrease in the number of leucocytes. These, may appear changed and containing frequently cocci and diplobacilli. The part that this synbacterium plays in the production of the cases of splenomegaly in which it has been observed is not then considered as proved, but PINOY presumes that it should produce an acute febrile disease, whose chronic state would correspond to the studied conditions of splenomegaly.

In the beginning of 1927, PINOY and NANTA's ideas already had evolved and in a note presented again to the Academy of Sciences of Paris, these authors for the first time attributed to the pathogenic action of fungus of the *Aspergillus nidulans* group the cases of splenomegaly so far

studied by them. The pseudo-cysts at first attributed to the synbacterium would represent now fructifying organs, now ornamental organs of the peritheca: *Gamna's nodules*, they say, *are mycotic nodules and the cases of splenomegaly with Gamna's nodules are cases of mycetomata of the spleen.* The bacteria which were found probably are only brought in, introduced by the fungus, as secondary infection. In the same note PINOY and NANTA suggest the possibility of the Egyptian splenomegaly having the same mycotic etiology and they insist upon the prevalence in Algeria of such mycosis of the spleen. In a note presented to the *Congrès pour l'avancement des Sciences,* in CONSTANTINE, in the beginning of 1927, PINOY proposes for the fungus isolated from the spleen which he had studied the creation of a new species which he calls *Aspergillus nantae* and which would be distinguished from *Aspergillus nidulans*, among other characters, by the absence of perithecia in the cultures.

Not long after P. ÉMILE-WEIL, GRÉGOIRE and FLANDRIN presented to the Medical Society of the Hospitals of Paris seven Parisian cases of primitive mycotic splenomegaly out of sixteen spleens obtained surgically or on autopsy. The authors insist upon the difficulties of the clinical diagnosis and point out the interpretation of the splenic lesions as due to the infection by a fungus. They describe GAMNA's nodules as surrounded by giant cells which englobate spores, mycelial fragments and granulations of a pigment which stains in blue with the potassium ferrocyanid. The nodules would be full of mycelial threads which, however, would show none or little staining by the blues. *Aspergillus*-like heads are also found by P. É.-WEIL, GRÉGOIRE and FLANDRIN who still point out the extensive invasion by the mycelium of the arterial and venous walls. Also large spores, encapsulated, with one or more coverings were pointed out in these Parisian cases just as they had been in the Algerian ones by NANTA and PINOY. P. É.-WEIL, GRÉGOIRE and FLANDRIN consider that the appearance of the fungus is so characteristic and constant that its existence could not be questioned even if the cultural experiments should fail. In two cases, the three quoted authors succeeded in isolating from the spleens under examination a fungus different from that of NANTA and PINOY, from which they concluded that the mycotic splenomegaly can be produced by different species of aspergilli.

In Paris P. ÉMILE-WEIL, GRÉGOIRE and FLANDRIN, therefore, and soon after ASKANAZY and SCHWEIZER, confirm and amplify the conclusions of NANTA and PINOY. The latter authors, in their turn, find support to their ideas in one experiment which according to them shows the virulence of the fungus culture which, venously, is able to kill a rabbit in 8 days causing lesions comparable to those produced by *Aspergillus fumigatus* and comparable, to a certain extent, although much more acute, with those observed in cases of human splenomegaly.

Other cases of SABRAZÈS and MURATET, BÉCART, COYON, WILLEMIN CLOY and BRUN, ARSEN PRODANOS have been published and presented in support of the same ideas of the mycotic nature of certain cases of splenomegaly.

The wide authority of some of the investigators who brought all such contributions, particularly the recognized experience of PINOY who is one of the most able men among those engaged in work on medical

mycology, appeared to envolve the observations with such guaranties of exactness that the existence of mycosis of the spleen and of its intervention in the production of splenomegaly of the type observed in BANTI's and other diseases turned to be considered certain.

It did not take too long, however, until restrictions began to be made concerning the relation which might exist between the mycotic infection and the observed morbid signs. OBERLING in the beginning of the present year, found siderotic nodules in a case of lymphatic leucaemia and considered them constant in the cases of BANTI's disease, the typical nodules, the mycotic nature of which he does not question, having been demonstrated abundantly even in material from one of the cases studied by BANTI himself and kept at the Pathological Institute of Strasburg. The presence of lesions considered as mycotic in a great number of cases of various affections led OBERLING to doubt that they might be due to the primitive infection and to admit that these lesions represented secondary implantation of fungi in pre-existing lesions of variable nature.

A. GOSSET, S. BERTRAND and J. MAGROU, after inoculating a suspension of *Aspergillus nantae* spores in the splenic pulp and in the perirenal tissue of a rabbit, obtain at the end of 43 days a splenomegaly accompanied with ascitis and pseudo-pulmonar tuberculosis. The search for mycelial filaments in the sections of the inoculated animal was negative, only elements of doubtful nature being found, perhaps degenerated fragments of the inoculated fungus. The authors think on the possibility of a filtering form of *Aspergillus*. To suppose that the splenomegaly and the other observed lesions did not represent a consequence of infection by the fungus but delayed results of the traumatism or of the introduction of foreign bodies or substances into the mass of the splenic parenchyma is more logical and natural.

The first clearly discordant voice out of the unanimous conformations of NANTA and of PINOY's works, came from CARLO GAMNA, one of the observers who first studied the siderotic nodular lesions of the spleen. GAMNA refers that he observed the nodules described by him in cases of BANTI's disease, splenomegalic atrophic cirrhosis, constitutional haemolytic jaundice, of STILL's disease, whilst OBERLING had found them still in cases of pigmentary cirrhosis LAENNEC's atrophic cirrhosis, calculous cirrhosis, etc. Besides, CHRISTELLER and PUSKEPPELIES, EPPINGER, KLINGE and HENNINGS, SIEGMUND, WOHLWILL, SCHUPPISSER, KRAUS, KLINGE, NICOD, DAY and JERGUSSON had verified identical lesions in various forms of chronic splenomegaly, without seing in them any sign of mycelial formations.

GAMNA reminds that the filamentous and siderotic formations of the pseudo-mycelium found in the nodules of the spleen are known of the histologists as a result of regressive transformations of elements of the tissues and that their only presence is not reason enough to admit the possibility of a case without precedent in the history of medical mycology, of primitive and circumscribed infection by a fungus of an organ such as the spleen.

Just after GAMNA, LANGERON makes a detailed study of PINOY and his coworker's observations and conclusions. He shows that the cultures from which the fungus accused of producing the mycosis of the spleen

was isolated were impure cultures, that the fungus is incriminated after having been so a spirochaete and a myxobacterium, that the identification of the *Aspergillus* since the beginning was hesitating, that the designation of mycetoma is incorrectly applied to the supposed mycosis of the spleen where the presence of pus and fistulae is not pointed out.

The notion of splenic mycosis, such as PINOY, NANTA and their coworkers had attempted to establish it, was thus already deeply shaken when we decided to make a revision of the material from splenomegaly cases existing at the Department of Pathology of the Instituto Oswaldo Cruz of Rio de Janeiro (1). We verified then the existence of many cases in which there had been pointed out siderotic nodular lesions of a type entirely identical to that described by GANDY, SYMMERS, GAMNA and many other authors. Some of these Brazilian cases had already supplied material for an inaugural dissertation issued from the Laboratories of the Instituto and presented to the *Faculdade de Medicina* of Rio de Janeiro in 1923 by Dr. HERMINIA DE SOUZA ASSIS. Of these cases, some did not show lesions that might lead to confusion with mycotic lesions. Others there were, however, in which the individualization of GANDY-SYMMERS-GAMNA's nodules was very prominent, its aspect resembling really that of mycetoma grains and, furthermore, that of the grains found in staphylococcic botryomycosis.

In the sections stained by hematoxyline and eosine, are found, sometimes in a great number, scattered in the tissue of the organ, more frequently near the vessels, masses of homogeneous appearance (Fig. 3) and different shape. They may be roundish, in form of band or of clue, and are stained in rose at the periphery, colourless or grayish at the center, usually accompanied by filamentous forms of the same colour isolated or forming more or less compact bundles, whose elements are different from one another. Often these filaments roll themselves up around a vessel. Beside such formations stained in rose or in clear-gray and, although anhists, comparable sometimes to mycetoma grains, are found in other points of the section filamentous elements (Fig. 4), yellow greenish or more or less intensely blueish, rectilineal, sinous or clue-like, sometimes bifurcate, of irregular diameter, formed of roughly quadrangular segments separated by clear linear spaces, free from any covering and formed of a compact and anhist substance. In some points, roundish formations (Fig. 5) constituted by a central clear space surrounded by several layers of filamentous elements stained blue, dark-gray or greenish-yellow, arranged into concentric circles or into parallel undulations, appear to correspond to transverse sections of deeply changed vessels.

The aspect of all of these structures may at first sight impress one as resembling that of mycelial elements and of mycetoma grains. A minute observation, however, of the spleen sections from the Brazilian cases of splenomegaly which we have had the opportunity of examining, permitted us not to verify the presence of a single element which unquestionably might be attributed to fungi. Much on the other hand, all the for-

---

(1) Acknoledgements to our colleagues of that Department, Drs. MAGARINOS TORRES and OSWINO PENNA, who put at our disposal their collections.

mations found showed transitions to such other elements wich visibly could not be considered mycelial and in fact were connected with changes of tissues wich are observed in much different morbid conditions. It is as such that, in accordance with GAMNA and with LANGERON, we interpret the structures observed in the siderotic nodules of the spleen in the Brazilian cases.

Now we should refer here the very great difficulty that one finds sometimes when the correct identification of elements of fungi in the tissues is sought. It has not been long since a patient, a student of medicine, came to the Dermatological Clinic of the Medical School of Rio de Janeiro. He presented two great ulcero-crustous lesions of the fore-arm which clinically we considered as suspicious of mycotic origin. Having been performed the biopsy, the sections showed many filaments sometimes branched and gemmating which seemed to confirm the clinical suspicion. None of the filamentous formations in question showed, however, the indubitable aspect of mycelium and, as the cultural tests yielded no concluding results and as we only isolated common fungi from such open lesions, the hypothesis of mycosis was gradually discarded. On making a better inquiry we were able to learn from the patient that he was an epileptic and that he had been since long under treatment with BARASCH's specific which, as it is known, has as its base the bromide of potassium. We were dealing with a case of intoxication by this salt, thus a case of bromide, which was followed by complete cure upon the pure and simple suppression of the intoxicating medicin.

This case was very instructive to us and made us acquire and experience which has been very useful in our searches for fungi on sections of animal tissues.

We think that in the case of splenomegaly in which siderotic nodules are observed, all those aspects which PINOY, NANTA and others have been describing lately as belonging to a pathogenic *Aspergillus* are degenerative.

(Laboratory of Mycology of the Instituto Oswaldo Cruz)

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

BIBLIOGRAPHIA

1—SYMMERS, D., GETTLER, A. O. and JOHNSON, W. M.—1919—Variety of massive syphilitic splenomegaly attended by remarkable vascular changes. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, v. 28, n. 1, p. 58.

2—ASSIS, HERMINIA DE SOUZA—1923—Sobre uma variedade de esplenite syphilitica caracterizada pela lesão de SYMMERS-GAMNA (focos de necrobiose-siderotica). *These da Faculdade de Medicina* do Rio de Janeiro, 74 pp., 3 est., bibl. interc.

3—GAMNA, CARLO—1923—Contributo alla conoscenza della splenomegalie croniche primitive. *Haematologica, Archivio Italiano di ematologia e sierologia*, v. 4, f. 2, pp. 129-81, 6 figs., bibl. pp. 180-1.

4—CHRISTELLER, ERWIN und PUSKEPPELIES, MAX—1924—Die periarteriellen Eisen—nnd Kalkinkrustationen in der Milz. *Virchow's Archiv*, v. 250, pp. 107-35, bibl. pp. 134-5, 9 figs.

5—GAMNA, CARLO—1924—Su le lesioni siderotiche che si riscontrano nelle splenomegalie croniche. *Pathologica*, a. 16, n. 370, pp. 203-7, bibl. p. 207,5 figs.

6—NANTA, M. A.—1926—Une splénomégalie synbactérienne. *C. r. Académie des Sciences*, t. 182, n. 23, pp. 1427-9.

7—NANTA, PINOY et GRUNY—1926—Sur certaines splénomégalies granulomateuses, à type clinique de BANTI, de nature infectieuse. *C. r. Société de Biologie*, t. 96, pp. 635-6.

8—PINOY, E.—1926—Sur une synbactérie isolée de cas de splénomégalie. *C. r. Académie des Sciences*, t. 182, n. 23, pp. 1429-31.

9—ASKANAZY, M. und SCHWEIZER, A.—1927—Ueber sideromykotische Splenomegalie. *Schweizer medizinische Wochenchrift*, t. 57, n. 33, pp. 777-9, 2 figs.

10- ÉMILE-WEILL, P., GRÉGOIRE ET FLANDRIN—1927—La splénomégalie mycosique. *Bulletins et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux*, Paris, s. 3, a. 43, n. 17, pp. 713-7, Disc.: Etienne May e Noel Fiessinger, pp. 717-8.

11—ÉMILE-WEIL, P., GRÉGOIRE, R., CHEVALLIER, P. et FLANDRIN, P.—1927—La splénomégalie primitive aspergillaire. *Le Sang*, t. 1, pp. 509-509, 2 est.

12—GAMNA, C.—1927—Sur la clinique et l'étiologie de de splénogranulomatose sidérotique. *Le Sang*, t. 1, pp. 610-33, 1 est.

13—GOINARD, P.—1927—Sur certaines splénomégalies algériennes. *Thèse d'Alger. Paris, Arnette.*

14—NANTA, A.—1927—Une Mycose splénique. Étude histologique. *Annales d'Anatomie Pathologique et d'Anatomie Normale, Médico-Chirurgicale*, n. 6, t. 4, pp. 573-85, 3 figs. 1 est.

15—NANTA, A.—1927—*Algérie médicale*, p. 110, fig.

16—PINOY, E. et NANTA, A.—1927 – Aspergillose expérimentale chez de le Lapin. *C. r. des Séances de la Société de Biologie*, t. XCVII, n. 19, pp. 67—68, bibl. interc.

17—PINOY, E. et NANTA, A. – 1927—Sur l'existence fréquente d'une mycose de la rate en Algérie. *C. r. des Séances de l'Acad des Sciences*, n. 6, t. 184, pp. 347-48, bibl. interc.

18—GAMNA, CARLO—1928—A propos de la Mycose splénique, *La Presse Médicale*, n. 23, p. 357, bibl.

19—GOSSET, A, BERTRAND, Y. et MAGROU, J. – 1928—Recherches sur l'aspergillose splénique. *C. r. Société de Biologie*, t. 98 pp. 769-70.

20—LANGERON, M.—1928 – Les prétendues mycoses de la rate. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, t. VI, n. 2, p. 211.

21—LANGERON, MAURICE—1928—Que penser des Mycoses de la rate? *La Presse Médicale*, n. 31, pp. 481-82, bibl. interc.

22—LANGERON, MAURICE—1928—Réponses aux objections de MM. NANTA, P. ÉMILE-WEIL et PINOY. *La Presse Medicale*, n. 37, pp. 580-81.

23—NANTA, ÉMILE-WEIL, P. et PINOY—1928 – A propos du mémoire de M. LANGERON. Que penser des mycoses de la rate? *La Presse Médicale*, n. 37, pp. 579-80.

24—OBERLING, CH.—1928—Le role pathogène de la Mycose splénique de NANTA. *La Presse Médicale*, a. 36, n. 1, pp. 2-3, bibl. interc.

Relatorio a respeito de algumas pesquizas sobre a febre amarella.

Pelo Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO.

(Chefe de Serviço)

Os casos de febre amarella recentemente occorridos no Rio de Janeiro nos offereceram opportunidade para uma serie de pesquizas experimentaes, sobre o assumpto, cujos resultados dão motivo ao presente trabalho. Antes de relatal-os aproveitamos o ensejo para externar aqui os nossos sinceros agradecimentos aos Drs. CLEMENTINO FRAGA, ROCHA LIMA, FREDERICO SOPER, NELSON DAVIS, JOHANNES BAUER, BARROS BARRETO, SINVAL LINS, BRUNO PESTANA, RAUL DI PRIMIO, AMADEU FIALHO, ARRUDA BOTELHO, CARLOS DRUMMOND, assim como aos Drs. CARLOS CHAGAS, ALCIDES GODOY e todos os collegas companheiros de Manguinhos pelo valioso auxilio que, por diversas maneiras, prestaram a essas investigações.

Os assumptos que mais de perto nos interessaram até aqui foram os seguintes:

I. Transmissão da febre amarella aos macacos.
II. Pesquizas do virus no sangue e orgãos de individuos fallecidos de febre amarella.
III. Pesquiza da *Leptospira icteroides* no doente, no cadaver e nos macacos infectados.
IV. Identidade entre febre amarella africana e a sul americana.
V. Diagnostico sôrologico da febre amarella.
VI. Vaccinação contra a febre amarella.

I

TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELLA AOS MACACOS.

A descoberta, por parte de STOKES, BAUER e HUDSON de que a febre amarella na Africa era transmissivel aos *Macacus rhesus*, veio abrir largo campo para as pesquizas experimentaes sobre o assumpto, no qual até então, só tinham tido successo seguro as experiencias feitas no homem. Os casos de febre amarella do Rio de Janeiro nos offereceram opportunidade para que egualmente tentassemos obter a transmissão da molestia americana a algumas especies de simios, usando nós, com esse objectivo, até agora de exemplares das seguintes especies: *Macacus rhesus, Macacus cynomolgus, Macacus speciosus* todos estes de origem asiatica e da especie brasileira, muito commum, *Pseudocebus azarae*.

As tres primeiras especies se mostraram sensiveis sendo possivel produzir nellas a infecção amarillica tanto por inoculações de sangue humano como pela picada e inoculações de mosquitos experimentalmente infectados em doentes, ou ainda pela inoculação nos animaes dessas especies, de sangue e orgãos de macacos infectados no laboratorio.

A maioria de nossas observações foi feita em *Macacus rhesus*, dos quaes temos tido em uso bastantes exemplares.

As inoculações de material humano em *Macacus rhesus* e *cynomolgus* foi feita com material retirado de 21 doentes, uns com formas graves, outros benignas, sendo 16 com 10 a 72 horas de molestia e 5 com prazo maior de 3 dias. Esses sangues foram inoculados em 26 *rhesus* e 1 *cynomolgus*.

Algumas vezes por dispormos, no começo, de poucos animaes fomos obrigados a inocular sangue de dous doentes em um unico animal; desde, porêm, que tivemos *rhesus* em maior numero se tornou possivel injectar cada sangue em um macaco e ás vezes o sangue do mesmo doente, em differentes dias de molestia, foi inoculado a varios macacos.

As quantidades de sangue injectadas oscillaram entre 5 e 10 cc.; raramente mais. Ora o sangue era citratado, ora não, e, neste caso, o que se injectava era sôro, ás vezes um tanto sanguinolento, pela presença nelle de muitos globulos vermelhos.

As infecções mortaes, obtidas nos macacos inoculados com sangue de doentes com menos de 72 horas, alcançaram o numero de 4, tendo sido negativas todas as feitas com sangue de individuos com mais de 72 horas de molestia.

Dos macacos que não morreram em consequencia de injecções de sangue de doentes com menos de 72 horas, um certo numero apresentou reacções febris, mais ou menos typicas, algumas das quaes foram evidentemente uma infecção benigna, porquanto esses macacos inoculados ulteriormente com o figado virulento nenhuma reacção apresentaram, demonstrando que estavam immunes. Outros macacos, porêm, nas mesmas condições que os anteriores, injectados com o mesmo virus, succumbiram á injecção, parecendo não terem tido uma infecção especifica, ou a immunidade por acaso por elles adquirida, em consequencia da injecção do sangue do doente, não foi sufficiente para protegel-os contra a infecção produzida pela inoculação de material virulento.

Observámos uma vez que o sangue de um doente (caso grave e mortal) injectado em dous dias successivos causou a morte do animal com a amostra colhida 36 horas depois do inicio da molestia, ao passo que, aquella que foi retirada estando o doente com 10 horas apenas, não produziu, no animal, senão pequenas oscillações febris pouco typicas. Este macaco, porêm, se mostrou immune á injecção ulterior de virus, o que demonstrou ter elle tido uma infecção ligeira mas insufficiente para produzir a sua morte. Os mosquitos que sugaram o mesmo doente tanto com 10 como com 36 horas de molestia se infectaram e se mostraram capazes de transmittir a molestia ao *Macacus rhesus*.

Dos 4 casos em que a inoculação de sangue produzio uma infecção mortal nos macacos, 3 provinham de doentes muito benignos de febre amarella e 1 de um caso grave mortal, o que parece demonstrar que os casos benignos são mais favoraveis á infecção dos macacos do que os graves. Na maioria dos casos as injecções de sangue foram feitas no mesmo dia da colheita, mas não ha nenhum inconveniente em que o sangue seja conservado na geladeira a 8 gráos, pois tivemos 2 inoculações positivas com sangue que estivera 48 horas naquella temperatura, e 1 com sangue guar-

dado, nas mesmas condições, durante 9 dias. Estes mesmos sangues que foram positivos com 48 horas deram resultados negativos quando inoculados com 14 dias de conservação em temperatura de 0º, não nos parecendo que a conservação do virus a frio, seja segura alem de 10 dias, nem que temperaturas abaixo de zero sejam especialmente favoraveis para isso, pois não observámos melhor conservação do virus nesta temperatura.

Os resultados das inoculações de sangue dos doentes nos *Macacus rhesus* mostram que estes simios não são tão sensiveis quanto fôra de esperar-se e, que de um grande numero de animaes, sómente alguns delles vêm a morrer, e outros ou têm uma infecção ligeira ou nada apresentam e nem mesmo adquirem, alguns, uma immunidade solida capaz de os fazer resistir a uma inoculação ulterior do virus.

A actividade do virus isolado do animal não parece ser desde logo muito grande, depois de 4 passagens não obtivemos mais de 0,2 cc. de sangue como dose minima mortal, mas certamente, com inoculações successivas em *rhesus*, afinal se conseguirá obter virus capazes de matar na dose de 0,0001 milligramma, como succede aos isolados na Africa.

A molestia no *rhesus* infectado pela inoculação de sangue de doente, ou sangue e orgãos de outro *rhesus*, ou a obtida pela picada do *Aedes ægypti* ou pela inoculação de emulsões desses insectos, evolue num prazo que varia de 5 a 15 dias, sendo este o periodo maximo por nós observado. A doença transcorre, entre nós, de modo absolutamente semelhante ao observado nos animaes infectados com os virus isolados na Africa, pela commissão americana.

Nos casos de evolução rapida a temperatura se eleva, ás vezes, desde os primeiros dias; outras vezes ha, a principio, algumas alternativas de elevações e baixas de temperatura, mais ou menos accentuadas, e no 4º e 5º dias a curva thermica sobe bruscamente de 1 a 1,5 gráos acima da normal primitiva do animal e no dia seguinte começa a cahir, rapidamente, entrando elle em hypothermia accentuada e afinal morre em collapso. Os traçados juntos (figs. 6, 7 e 8) dão uma ideia clara das curvas thermicas em taes casos.

Geralmente, no periodo em que a temperatura se eleva bruscamente, o animal perde o appetite e começa a apresentar menor vivacidade. Quando ella principia a cahir rapidamente abaixo da normal o macaco fica triste, encolhido a um canto da gaiola, deixa-se facilmeute apanhar e muito enfraquecido apoia o corpo nos membros dianteiros um tanto affastados um do outro, e sua cabeça pende para diante, numa posição muito caracteristica. Finalmente o animal tomba a fio comprido na gaiola e não tarda a morrer. (Figs. 2 e 3).

Nem sempre, porêm, uma baixa accentuada da temperatura é signal seguro de morte do animal, o qual póde recuperar a temperatura e curar-se mesmo depois de uma quéda brusca de cerca de dous a tres gráos abaixo da normal.

Quando a molestia se prolonga muito, então a regra é haver duas ou mais elevações thermicas, seguidas de periodos de temperatura quasi normal, ou sub-normal, antes que occorra a morte do *rhesus* (Figs. 4 e 5). Ha casos ainda em que a molestia evolue durante dias após á inoculação de sangue virulento sem alterações thermicas notaveis; permanecendo a curva

quasi inalterada para só se elevar nos dous dias que precedem a morte do animal (Fig. 9).

Além das infecções com sangue humano tambem foi possivel obter a infecção dos *Macacus rhesus* por meio da picada de mosquitos que tinham sugado o doente 17 a 30 dias antes, sendo sufficiente, neste ultimo caso, um só mosquito para produzir uma infecção mortal no macaco.

Duas vezes tambem nos foi possivel obter a infecção de um *rhesus* pela inoculação de emulsões de mosquitos, experimentalmente infectados, sendo que uma dellas foi conseguida pela inoculação de emulsão de 10 *Aedes ægypti* que 5 dias antes haviam sugado um doente. Esta experiencia mostra que o virus da febre amarella existe no mosquito, em boas condições para infectar, antes que este seja capaz de transmittil-o por picada, isto é, que tenha virus no seu apparelho secretor salivar, o que confirma os resultados anteriormente obtidos na Africa por BAUER e HUDSON.

Nem todos os *Macacus rhesus* inoculados com o virus de outro *rhesus* anteriormente infectado apresentam uma molestia typica e vêm a morrer. Não poucos escapam depois de apresentarem alterações thermicas elevadas, dias seguidos, e chegarem a ter as urinas muito amarellas e carregadas de albumina como é a regra nos periodos adiantados da molestia no *rhesus*. Este facto talvez seja devido á virulencia ainda não bastante forte do virus ou talvez a uma outra causa ainda por esclarecer.

Como ja tivemos occasião de dizer, além do *Macacus rhesus* tambem pesquizámos a sensibilldade do virus amarillico para o *Macacus cynomolgus*, o *Macacus speciosus* e o *Pseudocebus azarae*.

O primeiro *Macacus cynomolgus* nós o infectámos inoculando-o com sangue de 2 doentes atacados de febre amarella benigna e o animal veio a morrer 8 dias depois com a fôrma typica da molestia, curva thermica caracteristica e lesões anatomopathologicas macro e microscopicas absolutamente eguaes ás dos *Macacus rhesus*. Um segundo *cynomolgus* inoculado com 0,2 cc. de sangue de um *rhesus* infectado morreu do mesmo modo que o anterior, 6 dias depois da inoculação, com lesões e curva thermica caracteristicas (Fig. 8).

Em ambos os casos se tratava de animaes adultos e muitos desenvolvidos. Temos a impressão de que o *cynomolgus* é um macaco tão sensivel quanto o *rhesus* á inoculação do virus humano ou de origem animal e pelo seu grande tamanho offerece vantagem para certas experiencias, pois não sómente póde fornecer grande quantidade de sangue como de orgãos, o que tem importancia no caso do preparo de vaccina anti-amarillica.

Da especie *Macacus speciosus* só tivemos um exemplar de 3 mezes de edade. Este macaco foi inoculado com a emulsão de figado de um *rhesus* que morrera de febre amarella e teve uma forma prolongada da molestia com algumas elevações thermicas (Fig. 5) e veio a morrer, ao cabo de 13 dias da inoculação, com lesões caracteristicas, porém mais discretas que as dos outros dous macacos já experimentados.

Quanto ao *Pseudocebus azarae* só tivemos occasião de inocular 2 exemplares; um com sangue de um doente com mais de 72 horas de molestia não teve reacção alguma; outro injectado com virus de *rhesus* teve febre durante varios dias, mas sacrificado, ainda durante o periodo febril, nada apresentou de suspeito pelo exame anatomopathologico de suas visceras.

Alem destas especies de simios não temos usado de outras nas experiencis até agora feitas.

As lesões anatomo-pathologicas nos macacos sensiveis á infecção amarillica, o *M. rhesus*, o *M. cynomolgus* e o *M. speciosus*, são de um modo geral as mesmas e em tudo identicas ás observadas nos macacos infectados com o virus africano, e muito semelhantes ás do homem, e como estas, absolutamente caracteristicas e constantes.

Estas lesões de um modo geral são as seguintes:

Ictericia pouco accentuada e só ás vezes notavel por uma cor ligeiramente amarellada da pelle e mucosas e pelo colorido da aorta. Hemorrhagias no estomago e intestino pódem ser encontradas especialmente nos casos em que a molestia é prolongada; ellas faltam ou são muito escassas e então quasi que limitadas ao estomago, nas formas agudas. Pequenas petechias podem ser observadas na pleura, no pericardio e endocardio. Coração em geral pallido e flaccido. Figado amarello camurça em muitos casos, em outros amarellado na totalidade do orgão, ou pardacento com áreas amarelladas mais ou menos extensas; lobulos visiveis e vasos injectados. O orgão é mais ou menos friavel e tem o seu colorido em dependencia com a gordura nelle contida.

Baço ligeiramente augmentado de volume com colorido vermelho escuro, ás vezes um tanto azulado. A superficie de secção é nitida, a polpa consistente e os glomerulos visiveis.

Rins um pouco augmentados, pardo amarellados mais claros que os normaes com a superficie de secção parda avermelhada e as camadas cortical e central distinctas. Capsula destacando-se bem. A bexiga contem, ás vezes, urina de colorido amarello intenso, rica de albumina e contendo cylindros hyalinos e granulosos.

O exame microscopico dos orgãos revela pequenas hemorrhagias no pulmão, coração, estomago e intestino em certos casos. No figado intensa degeneração gorda, necrose mais ou menos intensa das cellulas com alterações acidophilas do protoplasma e dos nucleos, pycnose e caryorrhexis. Não raro as cellulas perdem suas connexões normaes, outras apparecem com o aspecto de amebas. Os nucleos se córam mal e apparecem alterados na fórma. A necrose das cellulas occupa em geral a zona media do lobulo ao longo das traves de HENLE, mas póde se extender e apenas poupar a camada de cellulas que circumda o espaço porta. Infiltrações leucocytarias discretas no figado são frequentemente observadas.

No baço observa-se especialmente uma intensa hyperplasia dos folliculos e augmento das cellulas endotheliaes phagocytarias na peripheria do glomerulo. Nos rins a tumefacção turba lesões de nephrite aguda, degeneração gordurosa e necrose de cellulas; cylindros hyalinos e granulosos e as vezes os de calcio. No figado e rins as lesões são as classicas descriptas pelo Prof. ROCHA LIMA para a febre amarella humana.

A degeneração gordurosa existe em maior ou menor gráo em diversos orgãos, mas no cerebro se observa apenas congestão, não se notando a presença de gordura nas cellulas nervosas do macaco conforme verificações do Prof. JAKOB e Drs. AMADEU FIALHO e E. VILLELA.

As alterações nucleares das cellulas do figado estão sendo objecto

de estudos muito interessantes por parte de nosso collega Dr. MAGARINOS TORRES.

As lesões acima referidas, tanto as macro como as microscopicas, podem variar em intensidade conforme o caso e não faltam nos animaes que socumbem á infecção.

Quando porem se sacrificam os animaes no inicio do periodo thermico ou aquelles com baixa de temperatura post-febril mas inoculados com um virus ainda pouco activo e nos quaes provavelmente a molestia evoluiria para a cura, as lesões classicas do figado e rim podem faltar ou ser muito escassas.

Sempre porem que se sacrifica um animal tanto no periodo de hyperthermia como no de hypothermia mas cujo sôro sanguineo já está amarello devido aos elementos biliares nelle contidos e ha albumina na urina então não faltam as lesões de necrose do figado nem a nephrite, alem da classica degeneração gordurosa, etc.

As lesões anatomo-pathologicas dos macacos infectados com febre amarella no Brasil não differem das obtidas com o virus africano.

II

PESQUIZA DO VIRUS NO SANGUE E ORGÃOS DOS INDIVIDUOS FALLECIDOS DE FEBRE AMARELLA.

Tivemos occasião de pesquizar a virulencia do sangue e dos orgãos de amarellentos para o *Macacus rhesus* com material de 7 autopsias, feitas 1 a 4 horas após a morte, em individuos que tinham fallecido no 4º e 5º dia da molestia. Os macacos foram inoculados 1/2 a 2 horas após a autopsia, verificando-se, na occasião, por sementeiras, a ausencia de bacterias de associação secundaria nos orgãos, os quaes foram colhidos com a possivel asepsia e cujos fragmentos eram lavados em agua physiologica esteril, repetidas vezes, antes de serem usados. Uma parte do orgão depois de esmagada em um gral, com areia esteril, era diluida em 4 partes de agua physiologica, filtrada em gaze e a emulsão obtida servia então para as injecções nos macacos, por via subcutanea, na dose de 2 a 5 centimetros cubicos.

As inoculações foram feitas com sangue, figado, rim, baço, medulla ossea e cerebro. O figado foi injectado isoladamente em 3 *Macacus rhesus*, assim como o sangue e o rim em dous outros desses macacos. Quatro *rhesus* foram inoculados com mixturas de varios orgãos. Nenhum dos 9 animaes inoculados veio a morrer de febre amarella e dos que tiveram reacções febris dous que foram sacrificados nada apresentavam que fizesse suppor estarem infectados com o virus amarillico.

Tanto quanto se póde concluir por estes resultados parece que o virus da febre amarella não existe nem no sangue nem nos orgãos dos amarellentos, o que confirma o seu desapparecimento total, no organismo humano, depois do terceiro dia de molestia.

III

PESQUIZA DA *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*.

Em 15 casos de febre amarella as pesquizas feitas para descoberta da *Leptospira icteroides* pela verificação microscopica, isolamento em cul-

tura e pela inoculação em cobayas jovens do mais variado material, sangue, urina, de doentes em diversos estadios da molestia, assim como material colhido nos orgãos de cadaveres, figado e rim, alem de sangue e urina, todas deram resultados negativos. Os exames a fresco do material, em campo escuro, as impregnações e colorações não tiveram o minimo successo.

As cobayas inoculadas quando apresentavam temperaturas elevadas foram sangradas no coração ou sacrificadas sendo o seu sangue e emulsões de orgãos inoculados a outros animaes novos. As reacções febris nas cobayas porém, desapparecem ao cabo de 3 pasagens como já foi observado por STOKES, BAUER e HUDSON. No sangue e orgãos de taes animaes não se encontram *Leptospiras*. Tambem resultaram negativas as inoculações de sangue e orgãos de macacos em cobayas e tambem não deram resultados os exames directos para *Leptospiras* nesses animaes.

A prova de PFEIFFER, feita com 8 sôros differentes, provenientes de doentes com 8 a 15 dias de convalescença, resultou negativa *in vivo* em cobayas novas, quer com a *Leptospira icteroides* isolada na Bahia por NOGUCHI e seus collaboradores (raça Palmeira) quer com uma raça de *Leptospira icterohæmorrhagiæ*, continuando ambos os parasitas vivos, até 2 horas depois da experiencia, no peritoneo de cobayas injectadas com 1/2 cc. de sôro e 1/2 cc. de cultura.

Diante dos resultados negativos de todas estas pesquizas alliadas a outras anteriormente obtidas por diversos auctores na Africa (STOKES, BAUER e HUDSON, MATHIS e SELLARDS) e tambem no Brasil no homem (GOMES DE FARIA, MARQUES DA CUNHA, OLYMPIO DA FONSECA, BORGES VIEIRA, BURLE DE FIGUEIREDO) se póde concluir que a *Leptospira icteroides* não desempenha papel etiologico na febre amarella. Muito provavelmente a *Leptospira icteroides* figura nos casos em que foi isolada como um germe de associação secundaria provindo talvez do intestino nos individuos que ingerem aguas de má qualidade e polluidas por *Leptospira*.

Esta hypothese nos parece provavel em vista do isolamento, cada vez mais frequente, de *Leptospiras* pathogenicas para cobayas, directamente das aguas de minas, arrosaes, poços, etc., o que torna muito provavel que esses germes levados ao tubo digestivo com as aguas contaminadas passem ulteriormente para o sangue em certos estados infectuosos graves como a febre amarella.

Menos provavel nos parece a hypothese de que entre os casos de febre amarella estudados por NOGUCHI e seus collaboradores houvessem alguns de molestia de WEIL que não foram identificados e dos quaes tivesse isolado a *Leptospira* que foi denominada de *icteroides*.

IV

IDENTIDADE DA FEBRE AMARELLA AFRICANA E SUL AMERICANA.

Os trabalhos realizados entre nós durante a actual epidemia de febre amarella, nas condições as mais favoraveis, permittem excluir, segundo pensamos, o papel etiologico da *Leptospira icteroides* na febre amarella. Tambem na Africa os resultados a este respeito foram absolutamente negativos de modo que se póde concluir que nenhuma differença etiologica

existe entre as duas molestias, tanto a que reina na Africa como aqui entre nós, ambas devidas a um virus ainda desconhecido.

A identidade entre as duas molestias está, de resto, perfeitamente estabelecida pelos seus aspectos clinicos, lesões anatomo-pathologicas, epidemiologica e por terem ambas, praticamente, um só transmissor, o *Aedes ægypti*.

As experiencias aqui feitas vieram demonstrar que o *Macacus rhesus* era sensivel ao virus americano da mesma forma que ao virus africano, o que ainda mais identifica as duas molestias.

A estas provas ainda podemos juntar mais uma que é a da immunidade cruzada entre o virus africano e a americano.

Tendo o Dr. CARLOS CHAGAS trazido do Instituto Pasteur, conservados em gelo, fragmentos de figado de *rhesus* infectado com o virus africano, o material foi aqui inoculado 20 dias depois num *rhesus* e ulteriormente em outro. O primeiro macaco teve uma reacção febril de 40º no 5º dia e o segundo não teve reacção febril accentuada, parecendo que o virus perdera a virulencia ou a tinha já tão attenuada que era incapaz de causar a morte do animal.

Era de suppôr porêm, que esse virus embora attenuado fosse sufficiente para dar aos *rhesus* uma immunidade contra a inoculação de um virus homologo. De facto foi isto que se verificou, e os dous *Macacus rhesus* acima mencionados, injectados com uma emulsão de figado de *rhesus* infectado com o virus, aqui isolado, nenhuma reacção tiveram, ao passo que um testemunha morria em 7 dias, o que demonstra que a primeira inoculação com o material africano, embora sob uma fórma attenuada, fôra sufficiente para o proteger contra o nosso virus demonstrando a identidade delles.

V

TENTATIVAS PARA OBTER UM DIAGNOSTICO SOROLOGICO DA FEBRE AMARELLA.

Uma questão da mais elevada importancia na febre amarella é se conseguir um methodo seguro para o seu diagnostico, dado o grande numero dos casos que evoluem atypicamente, e dos que, por sua benignidade, não se differenciam de uma grippe banal, e que por esse facto e pela sua infecciosidade são mais perigosas sob o ponto de vista hygienico. Dahi o interesse que ha em descobril-os a tempo. Com esse objectivo procurámos, desde o começo de nossos trabalhos sobre febre amarella experimental, verificar si não seria possivel obter um diagnostico sorologico do mal, usando do desvio do complemento.

Pondo em pratica este methodo, empregámos ao começo, como antigeno, o sôro de doentes no 1º e 2º dias de molestia, na dose de 0,5 cc., e como anticorpo o sôro de convalescentes com 8 a 15 dias, na dose de 0,2 a 0,5 cc. O complemento empregado foi o de cobaya e como systema hemolytico usámos o sôro de coelho anti-carneiro e globulos de carneiro, lavados.

Os resultados das experiencias em 8 doentes convalescentes tendo sido negativos resolvemos substituir o antigeno, sôro de doente no inicio da molestia, por um extracto phenicado de figado de *rhesus*, preparado

emulsionando-se 5 grammas de polpa do figado, finamente esmagada, em 100 cc. de agua physiologica phenicada a 0,5%. A emulsão assim feita era filtrada em papel, depois deixada em repouso durante alguns dias, sendo então verificado o seu poder impediente. Este antigeno foi empregado na dose de 0,2 a 0,4 cc. com os mesmos sôros de convalescentes anteriormente usados, não dando, porem, resultado positivo algum.

Os resultados até agora obtidos nas experiencias de desvio do complemento não têm sido absolutamente favoraveis, mas é possivel que, com outras technicas, se chegue afinal ao resultado desejado.

O sôro dos amarellentos nenhuma influencia tem sobre as reacções de WASSERMANN que permanecem negativas e, tanto no começo como na convalescença da molestia, quando antecedentes de syphilis podem ser excluidos como podémos verificar em 8 casos por nós observados.

Como elemento para estabelecer um diagnostico de febre amarella ainda se pode aproveitar, em certos casos, as propriedades preventivas que adquire o sôro dos individuos que se curam da molestia.

O sôro de convalescente previne facilmente a infecção do macaco, como demonstram STOKES, BAUER e HUDSDN, ao passo que 2 c.c. de sôro de homem normal não têm acção alguma. Assim sempre que estivermos diante de um caso suspeito de ter sido de febre amarella, mas que pela benignidade ou por ter sido visto tardiamente não permittiu um diagnostico preciso, podemos esclarecel-o de um modo relativamente facil, pesquizando as propriedades preventivas do sôro. Tomam-se 2 c.c. de sôro do individuo suspeito ou injecta-se como elle um *Macacus rhesus*, 24 horas depois inocula-se o mesmo animal com uma dose mortal de virus e se elle não adquirir a molestia é que o sôro usado é preventivo e ha toda a probalidade senão certeza de que o caso tenha sido de febre amarella; si, pelo contrario, o animal adoecer se deverá considerar o caso como negativo. Este é um methodo a experimentar e que póde prestar serviços ao hygienista, esclarecendo certos casos duvidosos, permittindo a filiação de uns casos a outros e fornecendo ao hygienista dados epidemiologicos mais precisos e muito proveitoso em certos casos.

O processo já foi usado em tres casos de certa importancia epidemiologica nesta cidade, observando-se em dous delles, resultados positivos com a verificação das propriedades preventivas do sôro dos individuos suspeitos e no terceiro caso foi a prova considerada negativa e excluida a suspeita de febre amarella por não ter o sôro protegido o *rhesus* contra a inoculação do virus. Foram de grande utilidade para os trabalhos epidemiologicos da Saúde Publica os reultados obtidos com o emprego deste processo de diagnostico para o esclarecimento dos tres casos acima referidos.

VI

VACCINAÇÃO CONTRA A FEBRE AMARELLA.

A vaccinação contra a febre amarella póde ser feita por dous methodo diversos, tanto pela immunização passiva por inoculação de sôro de convalescentes ou de um macaco immunizado por inoculações repetidas de material virulento, como pela inoculação de uma vaccina preparada com sangue ou orgãos de macacos infectados.

Temos empregado muitas vezes o sôro de convalescentes como methodo de protecção passageira contra a infecção. Primeiramente elle foi usado em Manguinhos para proteger aquelles que trabalhavam nos laboratorios com macacos infectados e ulteriormente o seu emprego foi ampliado a pessoas que habitam os fócos e á outras que se queriam proteger contra qualquer eventualidade. Orça por 50 a 60 as pessoas assim protegidas, tendo todas supportado bem as injecções que, só num ou noutro caso, produziram uma certa depressão passageira, toda individual. O sôro usado foi o de pessoas que estavam com 15 dias a 1 mez de restabelecimento de ataques benignos e graves da molestia. Entre as pessoas assim protegidas contra a febre amarella nenhum caso da molestia occorreu até agora, sendo usados nellas 1 a 2 c.c. de sôro. por via subcutanea, como dóse vaccinante.

O emprego do sôro de convalescentes é, no emtanto, de uso limitado, dadas as difficuldades que ha em obtel-o em grandes quantidades para emprego em mais larga escala.

Estamos immunizando, com sangue e orgãos de *rhesus* infectados, 1 cavallo e 2 carneiros e 6 rhesus, com o fim de obter delles um sôro que tenha eventualmente, uma acção immunizante sufficiente, de modo que elle possa ser com vantagem mais largamente usado, em certos fócos da molestia.

E' possivel tambem que o sôro de animaes immunizados cuja acção preventiva acaba de ser demonstrada no Intituto Pasteur de Paris, tenha tambem uma acção curativa efficaz no homem, quando empregado nos primeiros dias de molestia e em grandes quantidades.

A vaccina contra a febre amarella, destinada a ter o maior successo, é evidentemente a preparada com emulsão de orgãos de *Macacus rhesus* ou *cynomolgus* infectados e esterilizados por algum dos processos conhecidos.

A commissão franceza do Instituto Pasteur já havia demonstrado que o sôro aquecido, de um doente nos primeiros dias da molestia, quando o virus está presente nelle, tinha uma acção vaccinante evidente, em relação á infecção amarillica no homem. Era portanto de esperar que os orgãos do *Macacus rhesus* ou *cynomolgus* cheios de virus offerecessem condições muito favoraveis para o preparo de uma vaccina, e assim, desde que infectamos o primeiro *Macacus rhesus*, aproveitamos os orgãos do animal para preparla-a, reduzindo-os a uma polpa que, depois emmulsionada em agua esterilisada na proporção de 1: 9, foi filtrada em gaze e esterilisada pelos vapores de formol, seguindo a technica por nós usada desde 1911 para esterilisar a vaccina contra a espiroquetose das gallinhas.

Já estava a vaccina preparada e em experiencias no *rhesus* e no homem, quando recebemos o trabalho de HINDLE relatando seus interessantes e precursores trabalhos com as vaccinas por elle usadas contra a febre amarella, uma simplesmente formolada, outra glycerinada e phenicada, usando em ambas uma parte de figado para quatro da solução esterilisante, no primeiro caso formol a 1‰, e no segundo uma solução de 60% de glycerina em agua phenicada a 0,5%.

Resolvemos então preparar a vaccina glycerinada e phenicada, como recommenda HINDLE, e para comparação com esta, uma outra formolada a 2‰ e phenicada a 0,5%, visando obter nesta uma garantia mais perfeita de esterilidade em relação á bacterias e bolores, sem prejuizo da conser-

vação do virus. Estas duas vaccinas deram bons resultados nos *rhesus*, protegendo-os contra infecções experimentaes, e foram, por isso, experimentadas no homem.

Como a vaccina glycerinada se tivesse revelado mais dolorosa, começamos a usar no homem, em larga escala, a vaccina phenicada e formolada que é muito mais supportavel, dóe apenas um pouco, no momento da inoculação e não dá reacção ulterior.

A technica que actualmente usamos para o preparo da vaccína é a seguinte: Infecta-se um *rhesus* ou *cynomolgus* sadios, com uma quantidade certamente mortal do virus, e quando o animal, depois de ter a elevação thermica caracteristica, entra na phase de hypothermia e, ás vezes, antes mesmo della, é elle sacrificado pelo chloroformio. Os orgãos são immediatamente retirados com a maxima asepsia, usando-se no preparo da vaccina, o figado, rins, baço e cerebro, que são collocados em grandes placas de PETRI esterilisadas e cuidadosamente examinados. Uma vez reconhecido que estão perfeitamente sadios, são lavados em agua physiologica, enxutos em papel de filtro esteril e pesados.

Em seguida são os orgãos cortados em pequenos fragmentos que se collocam em um gral com areia lavada esteril, sendo então esmagados cuidadosamente. Isto feito, addiciona-se a uma parte de orgão, 5 de agua distillada esterilisada formolada a 2 por mil e phenicada a 0,5% agitando-se e descollando o material até obter uma emulsão fina e homogenea, que é filtrada em 4 folhas de gaze e recebida em um balão esteril. Este filtrado é a vaccina, que se colloca então durante 5 dias na geladeira, verificando-se, depois desse prazo, se sua esterelidade é completa por meio de sementeiras em meios anaerobios e aerobios e inoculação de 0,5 cc. em 2 cobayas.

Desde que os meios de cultura permanecem estereis, a vaccina é distribuida em empolas com os cuidados habituaes e semeada de novo. Si sua esterilidade é perfeita e se as cobayas, decorrido o prazo, permanecem sadias, é a vaccina considerada prompta para o emprego no homem.

A dóse que está sendo usada no homem adulto é de 2 c.c. por via subcutanea, tendo-se o cuidado de agitar a empola para emulsionar o material nella contido, que se deposita quando em repouso.

A vaccina formolada e phenicada, preparada como acima ficou, dito é um liquido roseo amarellado, turvo, dando um pequeno deposito e não tendo cheiro desagradavel, nem se sentindo o do formol ou do acido phenico nella contidos.

Esta vaccina começou a ser usada no Instituto Oswaldo Cruz entre as pessoas que nelle trabalham em febre amarella, e não tendo dado reacções desagradaveis, começou a entrar em uso corrente, e o Departamento de Saúde Publica já recebeu e a está empregando em maior escala, em pequenos fócos isolados de febre amarella e no Estado do Rio, podendo-se calcular que o total de pessoas vaccinadas já excede a tresentas. Ella tem sempre sido bem supportada. Não deu reacções incommodas e, entreos vaccinados, não houve caso algum de febre amarella, mas tratando-se de uma observação em pequena escala, não se pode ainda ter opinião definiva a respeito.

Actualmente cerca de 2 mil dóses de vaccina estão promptas para as experiencias á serem feitas pela Saúde Publica.

Com o proseguimento das experiencias de Laboratorio com a vaccina, e com o seu emprego em maior escala na pratica, é de esperar que se chegue, dentro em pouco, a resultados seguros sobre as suas vantagens praticas, tempo de conservação, duração da immunidade, etc.

São estes, em resumo, os resultados á que, até agora, chegamos nestas pesquizas sobre a febre amarella no Rio de Janeiro.

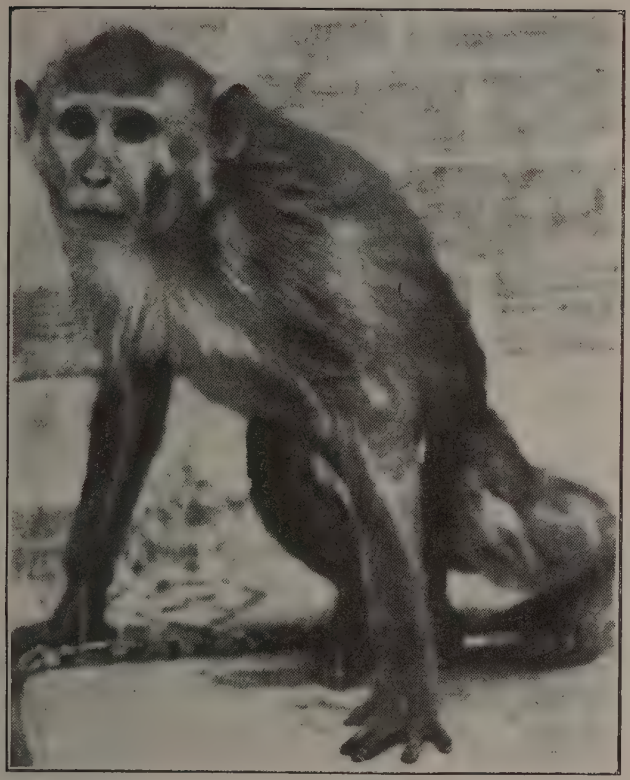


Fig. 1—*Macacus rhesus* normal.
Fig. 1—Normal *Macacus rhesus*.

Phot. J. Pinto.

Fig. 2—*Macacus rhesus* doente em periodo adeantado de hypothermia. Temp. 36°,2.
Fig. 2 –*Macacus rhesus*, ill, within the advanced period of hypothermy. Temp. 36°,2.

Phot. J. Pinto.

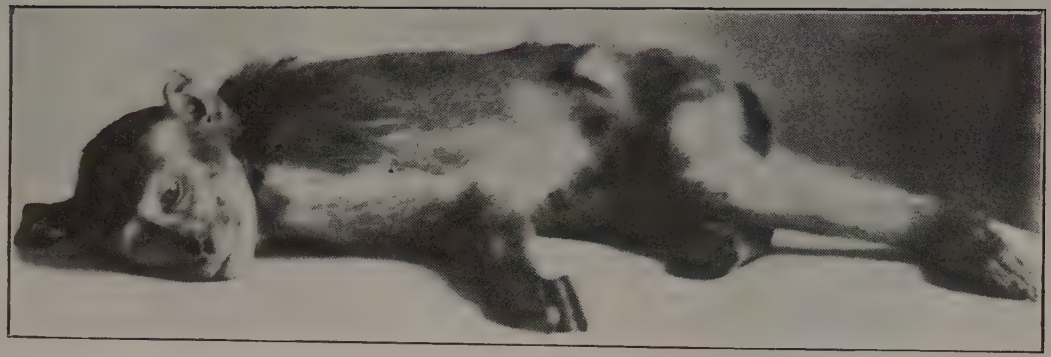


Fig. 3—*Macacus rhesus* doente, em coma, prestes a morrer. Temp. 33º,4.
Fig. 3—*Macacus rhesus*, ill, in collapse, about to die. Temp 33º,4.

Phot. J. Pinto.

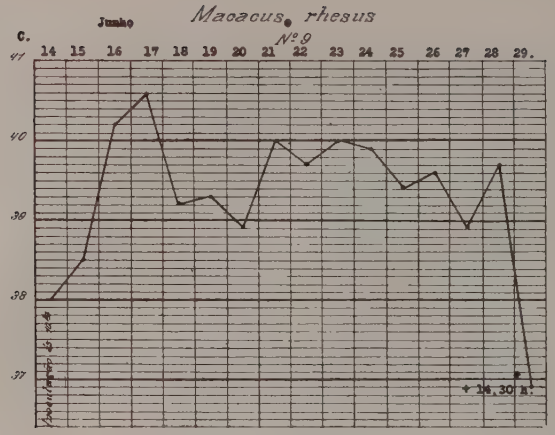


Fig. 4 - Curva thermica do *rhesus* 9. Infectado com 4 c.c. de sangue humano (casos benignos), com menos de 48 horas de molestia.

Fig. 4 – Thermic curve of the *rhesus* 9. Infected with 4 c.c. of human blood (slight cases), with less than 48 hours of duration.

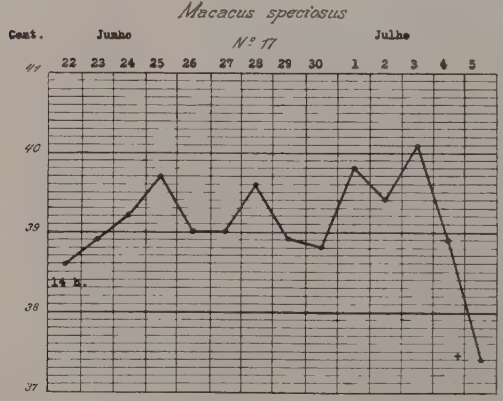


Fig. 5 - Curva thermica do *Macacus speciosus*. Infectado com 1 c.c. de emulsão de figado do *rhesus* n. 8.

Fig. 5—Thermic curve of the *Macacus speciosus*. Infected with 1 c.c. of emulsion of the liver of *rhesus* n. 8.

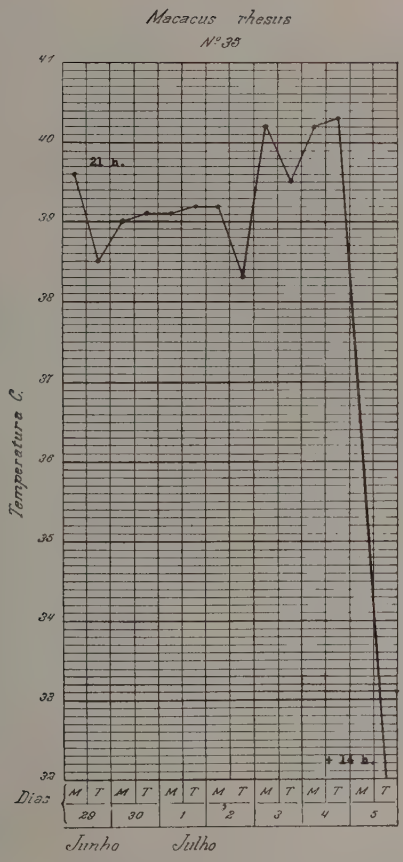


Fig. 6—Curva thermica do *rhesus* n. 35. Infectado por mosquitos que tinham picado, 17 dias antes, um doente com 29 horas de molestia.

Fig. 6 Thermic curve of the *rhesus* n. 35. Infected by mosquitoes, which had bitten, 17 days before, a patient with 29 hours illness.

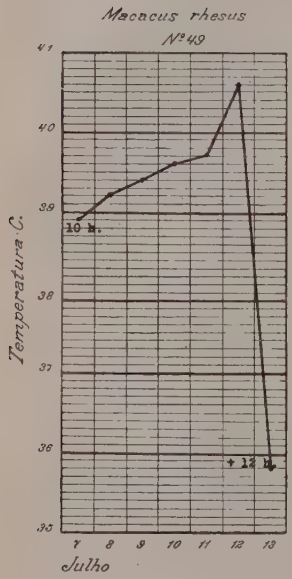


Fig. 7 -Curva thermica do *rhesus* n. 49. Infectado com 2 c.c. de sangue citratado do *rhesus* n. 35.

Fig. 7 – Thermic curve of the *rhesus* n. 49. Infected with 2 c.c. citrated blood of the *rhesus* n. 35.

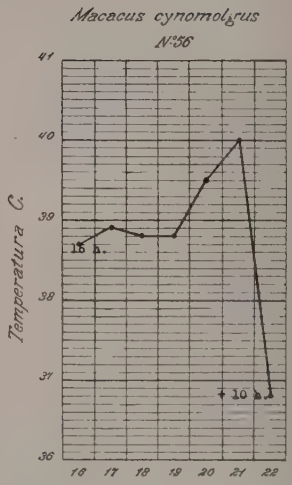


Fig. 8 - Curva thermica do *cynomolgus* n. 56. Infectado com 1/2 c.c. de sôro do *rhesus n. 49.*

Fig. 8—Thermic curve of the *cynomolgus* n. 56. Infected with 1 c.c. of Serum from *rhesus* n. 49.

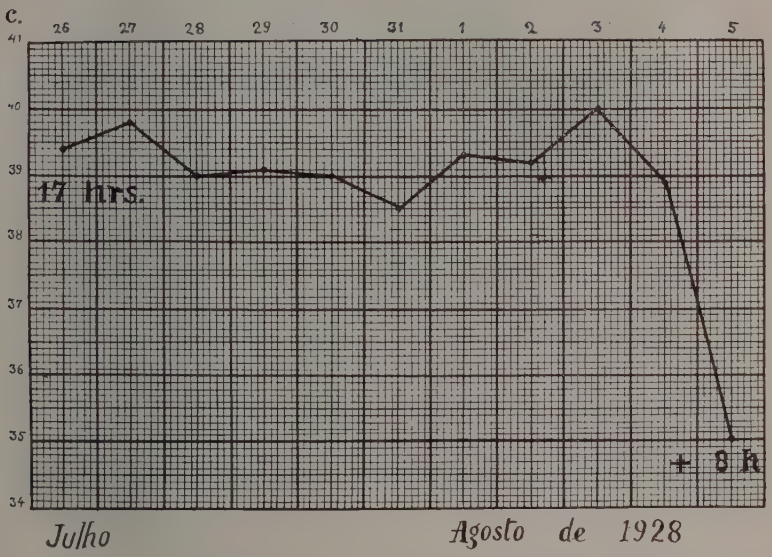


Fig. 9—Curva thermica do *rhesus* n. 76. Infectado com 0,2 c.c. de sôro do *cynomolgus* n. 56.

Fig. 9—Thermic curve of the *rhesus* n. 76. Infected with 0,2 c.c. of serum from the *cynomolgus* n. 56.

Report upon some researches on Yellow Fever.

By Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO

(Chief Service)

The cases of yellow fever, which lately occurred in Rio de Janeiro offered us an opportunity for a series of experimental researches on the subject, the result of which are the reason of the present work.

Before relating them, we avail ourselves of this opportunity to tender herewith our best thanks to Drs. CLEMENTINO FRAGA, ROCHA LIMA, FREDERICO SOPER, NELSON DAVIS, JOHANNES BAUER, BARROS BARRETO, SINVAL LINS, BRUNO PESTANA, RAUL DI PRIMIO, AMADEU FIALHO, ARRUDA BOTELHO, CARLOS DRUMMOND, as also to Drs. CARLOS CHAGAS, ALCIDES GODOY and to all our colleagues, companions of Manguinhos, for the valuable help lent to us, in various manners, for these investigations.

The subjects we were more immediately interested in, were the following:

I. Transmission of the yellow fever to monkeys.
II. Researching the virus in the blood and organs of persons who died from yellow fever.
III. Research of the *Leptospira icteroides* in the patient, in the corpse, and in infected monkeys.
IV. Identity of the African and American yellow fever.
V. Serological diagnostics of yellow fever,
VI. Vaccination against yellow fever.

I

TRANSMISSION OF YELLOW FEVER TO MONKEYS.

The discovery, by STOKES, BAUER and HUDSON, that yellow fever in Africa was transmissible to the *Macacus rhesus*, opened a wide field to experimental researches on the subject, in which up to the present, only the experiments tried in man had been undoubtedly successful. The yellow fever cases in Rio de Janeiro, offered an opportunity for us to also make attempts to transmit the American disease to a few kinds of monkeys, making use, up to now, to that object, of specimens of the following species: *Macacus rhesus*, *Macacus cynomolgus*, *Macacus speciosus* all of these, of Asiatic origin, and of the common Brazilian species *Pseudocebus azarae.*

The three first species proved sensible, for it was possible to cause in same, the yellow fever infection, as well by inoculating human blood, as by the biting or inoculations of mosquitoes experimentally infected through patients, as also by inoculating into animals of these kinds, blood and organs of monkeys, infected at the laboratory.

Most of our observations were made in *Macacus rhesus*, of which we could dispose of a rather fair lot.

The inoculations of human material in *Macacus rhesus* and *cynomolgus* were effected with material extracted from 21 patients, some of whom with severe, other with slight forms of the illness, there being 16 with 10 to 72 hours of contracting the disease and 5 with a duration of more than three days. These bloods were inoculated to 26 *rhesus* and 1 *cynomolgus*.

Sometimes, owing to our disposing at the beginning of but few animals, we were compelled to inoculate the blood of two patients te a single animal, nevertheless, since we had *rhesus* in higher quantity, it was possible to inject each blood to each monkey, and several times, the blood of a same patient, at different days of the illness, could be injected to several monkeys.

The quantities of injected blood oscillated between 5 and 10 c.c., seldom more. At times, the blood was citrated, in other cases it was not and in the latter, what was injected was the serum, sometimes rather sanguinolent, owing to the presence in it of many red globules.

The mortal injections, obtained in monkeys inoculated with the blood of patients with less than a 72 hours sickness, amounted to 4, having proved negative all those effected with the blood of individuals after more than 72 hours of the illness.

Of the monkeys which did not die consecutively to injections of blood from patients with less than 72 hours, a certain number would show more or less typical febrile reactions, of which obviously a certain number were a mild infection. while those monkeys, when inoculated, later on, with virulent liver showed no reaction, proving thus to be immunized. Other monkeys, however, under the same conditions as the previous ones, when injected with the same virus, died consecutively to the injection, appearing not to have had an own specific infection, nor was the immunity they perhaps adquired in consequence of the injection of the patient's blood, not sufficient to protect them against the infection produced by injecting the virulent stuff.

We observed once that the blood of a patient, (severe and mortal case), when injected on two successive days, caused the death of the animal with the sample extracted 36 hours after the illness had begun, whilst the one we extracted from the patient after only 10 hours, provoked in the animal only a few small atypical febrile oscillations. This monkey, however showed to be immune against a further injection of virus, thus, demonstrating, it had had a slight infection, insufficient, notwithstanding, to bring death as a result.

The mosquitoes which sucked the patient as well after 10 as after 36 hours of the illness, infected themselves and proved capable to transmit the disease to the *Macacus rhesus*.

Of the 4 cases in which the blood inoculation produced an infection fatal to the monkey, three proceeded from patients with a very mild attack of yellow fever and one from a severe and mortal case, which seems to demonstrate that slight cases are more favourable to the infections of monkeys than serious ones. In most of the cases, the blood injections were effected on the same day of the gathering, but there is no inconvenience

in keeping the blood in the ice-box at 8 centigrades, for we had two positive inoculations, using blood kept for 48 hours at this temperature and one with blood kept under the same conditions, during 9 days. Those same bloods, which were positive with 48 hours cooling, gave negative results when inoculated after 14 days cooling at 0º, which gives us way to suppose that the cool storage of the virus further then 10 days would not be safe, nor temperatures from zero could be particularly favourable to the object, for we dtd not observe a better preservation of the virus in such temperature.

The results of the inoculations of blood from patients to the *Macacus rhesus*, show that those monkeys are not so sensible as was expected, and that on a great number of animals, only but few happen to die, and other, either get a slight infection or show nothing at all, or even some ones do not acquire a firm immunity, capable to make them resist to a further inoculation of virus.

The activity of the virus, isolated from the animal does not appear to be immediately a very strong one; after 4 passages, we did not obtain more than 0,2 c.c. of blood as a minimum mortal dosis, but surely, with successive inoculations in *rhesus*, virus will at last be got at, capable of killing at a dosis of 0,0001 milligram, as occurs with those isolated in Africa.

The illness in the *rhesus* infected by inoculating patient's blood, or blood and organs of another *rhesus*, or that obtained by the bite of *Aedes ægypti* or by inoculating emulsions of those insects, develops within a period varying from 5 to 15 days, this latter being the longest time observed by us. The illness transcurs, amongst ourselves, in a way absolutely similar to that observed in animals infected with virus isolated in Africa by the American Commission.

In the cases of quick evolution, the temperature sometimes rises since the first days; other times there are, at first, some alternatives of rising of falling, more or less accentuated, of the temperature, and, on the 4th or 5th day the thermic curve rises suddenly from 1 to 1,5 grade over the primitive temperature of the animal, on the following day, it begins o fall suddenly, the animal entering then into accentuated hypothermy, at last dieing in collapse. The annexed diagrams (figs. 6, 7 and 8) give a clear idea of the thermic curves in such cases.

Generally, during the period when the temperature rises suddenly, the animal loses appetite and begins to show less liveliness. As soon as temperature begins to drop quickly under the normal, the monkey gets sad, keeps confined in a corner of its cage, allowing to be caught easily; very weakened, it supports its body on the forelimbs, a little disjoint one from the other, its head hanging forwards in a very characteristical position. Finally the animal falls all its length in the cage and does not take a long time to die (figs. 1 to 3).

Not always, however, a sudden accentuated drop of temperature is a certain premonition that the animal is to die, since it can take back temperature, after a sudden fall of about 3 grades under the normal.

When the illness lasts much, there occur, as a rule, two or more thermical risings, followed by periods of nearly normal or under normal

temperature, before the *rhesus* dies (figs. 4 & 5). There are besides cases in which the illness evolves for days subsequent to the inoculation of virulent blood, without serious thermic alterations; the curve remains almost inaltered and only rises during the two days before the animal dies (fig. 9).

Besides the infections with human blood, it has been possible to get the infection of the *Macacus rhesus* through the sting of infected mosquitoes which had sucked a patient 17 to 30 days before, being in this last case sufficient one mosquito to cause the monkey a mortal infection.

We also succeeded twice in obtaining the infection of a *rhesus* by inoculating emulsions op mosquitoes, experimentally infected. In the first case, we got at this result, inoculating an emulsion of 10 *Aedes ægypti* which, 5 days ago, had sucked a patient. This experiment shows that the virus yellow fever exists in the mosquito, suitable for infection, prior to this being able to transmit it, by stinging, that is to say, before it has virus in the salivary glands, which confirms the results previously obtained in Africa by BAUER and HUDSON.

Not all the *Macacus rhesus* inoculated with the virus of another *rhesus* infected before, show a typical illness and happen to die. Lots of them escape, after having shown high thermic alterations and very yellow urines, charged with albumin, as in the rule in the advanced stages of the illness in *rhesus*. This fact should perhaps be ascribed to the still not strong enough virulence of the virus or may-be, to another still unknown cause.

As we had already an opportunity to say, besides the *Macacus rhesus*, we also tested the sensibility to the yellow fever virus, of the *Macacus cynomolgus*, *Macacus speciosus* an the *Pseudocebus azarae*.

The first one, the *Macacus cynomolgus*, was infected by us, inoculating it with blood of two patients with a slight yellow fever, and the animal happened to die after 8 days with a typical form of the disease, a characteristical curve and macro and microscopic anatomopathological lesions, quite identical to those of the *Macacus rhesus*. A second *cynomolgus*, inoculated with 0,2 c.c. of blood from an infected *rhesus* died in the same way as the former, 6 days after the inoculation, with characteristical lesions and thermic curve (Fig. 8).

In both cases, we dealt with adult and very developed animals. We have a feeling that the *cynomolgus* is a monkey as sensible as the *rhesus* to the inoculation of human or animal virus, and owing to its big size, offers an advantage for certain experiments, as it is able, not only to provide a large quantity of blood but also of organs, which is of a great importance in the case of preparation of anti-yellow fever vaccine.

Of the kind *Macacus speciosus* we only had a specimen 3 months old. This monkey was inoculated with an emulsion of the liver from a *rhesus* which had died from yellow fever. It had a longlasting form of the disease, with a few thermic rises (fig. 2) and happened to die, after 12 days inoculation, showing characteristical but less acknowledged lesions than the two other already experimented.

As regards the *Pseudocebus azarae*, we had opportunity to inoculate only 2 specimens; one with the blood of a patient with 72 hours illness; there was no reaction; another one, injected with virus of a *rhesus*, had a

fever during several days, but, having been sacrificed still during the febrile stage, it did not reveal anything suspect, according to the anatomopathological examination of its viscera.

Besides those kind of monkeys, we did note use any other in the experiments effected till now.

The anatomopathological lesions in monkeys sensible to yellow fever infection, the *M. rhesus*, the *M. cynomolgus* and the *M. speciosus*, are in a general way the same and wholly identical to these observed in monkeys infected with African virus, and most similar to the lesions in man, and like these absolutely caracteristical and constant.

These lesions are, as a rule, the following:

Slightly accentuated jaundice, in few cases only to be noted by a slightly yellowish colour of the skin and the mucosae and by the shade of the aorta. Hemorrhages in the stomach and intestines may be observed, specially in cases when the illness is a longlasting one; they miss or seldom appear, and then, in acute forms, seem to be limited to the stomach. Slight petechiae can be observed in the pleura, in the pericardium and the endocardium. Heart generally pale and flaccid. Liver of a shammy colour in many cases, in other ones yellowish in the whole of the organ, or greyish with more or less extensive yellowish spots, lobules visible and vessels injected. The organ is more or less friable, its colour being in relation to the fat it contains.

Spleen slightly enlarged in volume, with dark red, sometimes rather blueish shade. The area of the section is neat, pulp consistent, and glomeruli visible.

Kidneys a little increased, yellowish grey, of slighter colour than the normal ones, with a reddish grey section area on the cortical and central coats distinct. The capsule appears clearly. The bladder contains sometimes an intense yellow coloured urine, rich in albumin carrying hyaline and granulated casts.

The microscopic examination of the organs reveals slight hemorrhages in the lung, heart, stomach and intestine in a few cases. In the liver, intense fatty degeneration, a more or less strong necrosis of cells with acidophilous alterations of the protoplasma and pycnosis of the nucleus, and caryorrhexis. Not seldom, the cells lose their normal connections, other appear with an aspect of amebas. The nuclei do not colour well and seem to be altered in shape. The necrosis of the cells occupies generally the medium zone of the lobule all along the HENLE's layers, but may extend further and spare only the coat of cells surrounding the portal space. Slight leucocytarian infiltrations in the liver are frequently observed.

In the spleen, an intense hyperplasia of the follicles and increase of the phagocytarian endothelial cells in the periphery of the glomerule is to be observed. In the kidneys the tumefaction troubles lesions of acute nephritis, fatty degeneration and necrosis of cells. Hyaline and granulous casts, sometimes those of calcium. In the liver and kidneys, the lesions are the classical as discribed by Prof. ROCHA LIMA for yellow fever in man.

The fatty degeneration is to be observed, on a more or less large scale, in several organs, but in the brain, hardly a congestion is observed, without nothing the presence of fat in the nervous cells according to what

was controlled by Prof. JAKOB and Drs. AMADEU FIALHO and E. VILLELA.

The nuclear alterations of the liver cells are being the object of very interesting studies on the part our colledgue Dr. MAGARINOS TORRES.

The above stated lesions, as well the macro as the microscopic ones, may be of varying intensity, according to the case, and do not miss in animals which die from the infection.

When however, the animals are sacrificed in the beginning of the fever period, or other are with low post-thermic temperature fall, but have been inoculated with a still little active virus, and in which probably the illness would be likely to evolve towards curing, the classic lesions of the liver and kidneys, may miss or be very rare.

Every time however, an animal is sacrificated, when in the period of hyper or hypothermy, but whose serum is already yellow owing to biliar elements contained in it, and whenever there is albumin in the urine, then there is no lack of lesions of liver necrosis nor of the nephritis besides fatty degeneration, etc.

The anatomo-pathologic lesions of the monkeys infected with yellow fever in Brazil, show no difference with those obtained with the African virus.

II

RESEARCH OF THE VIRUS IN BLOOD AND ORGANS FROM PERSONS WHO DIED FROM YELLOW FEVER.

We had an opportunity of prospecting the virulence of the blood and the organs of yellow fever patients to the *Macacus rhesus* with material from 7 autopsies, effected 1 to 4 hours post mortem, in persons who had died on the 4th and 5th day of the illness. The monkeys were inoculated, half an hour to two hours, after the autopsy, having been controlled, by this opportunity, by means of culture, the complete lack of bacteria of secundary association within the organs, which were gathered with all possible aseptic care, the fragments of which were repeatedly washed in sterile physiologic water, before waking use of them. One part of the organ, after having been squashed in a mortar with sterile sand, was diluted with 4 parts of saline solution, filtrated through gauze and the emulsion thus obtained served then for injections to the monkeys, subcutaneously, at a dosis of 2 to 5 cubic centimeters.

The inoculations were made with blood, liver, kidneys, spleen, bone marrow and brain. The liver was injected isolatedly to 3 *Macacus rhesus*, as well as the blood and kidney to two other of these monkeys. Four *rhesus* were inoculated with mixtures, of various organs. None of the 9 inoculated animals happened to die from yellow fever, and of those which experienced febrile reactions, two which were sacrificed, would show nothing from which might be supposed they were injected with yellow fever virus.

Anyhow, as far one may conclude from these results, it seems that the virus of yellow fever does not exist either in the blood or in the organs of yellow fever patients, which confirms its total desappearing in the human organism after the third day of the illness.

III

RESEARCH OF THE *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*.

In 15 cases of yellow fever, the researches intended to discover the *Leptospira icteroides* through microscopic verification, isolating in culture and through inoculation to animals of the most varied material, blood, urine of patients at different stages of the illness, as well as material gathered in organs of corpses, liver and kidney, besides blood and urine, all provided negative results. The examinations in fresh material in dark field, impregnations and colouring did not prove the least successful.

The inoculated Guinea pigs who showed high temperatures were bled off at heart, or sacrificed, their blood and emulsions of their organs being inoculated to other young animals. The reactions, on the young Guinea pig however, disappear at the end of 3 passages as was already observed by STOKES, BAUER and HUDSON. In the blood and organs of such animals, no *Leptospira* is to be found. Also negative have remained the inoculations of the blood and organs of monkeys to Guinea pigs, and also without a result remained the direct examinations about *Leptospiras* in these animals.

PFEIFFER's reaction effected with 8 different serums proceeding from patients with 8 to 15 days convalescence, remained likewise negative in vivo in young Guinea pigs, either with the *Leptospira icteroides* isolated in Bahia by NOGUCHI and his collaborators (Palmeira race) or with a race of *Leptospira icterohaemorrhagiae*, both parasites continuing alive, still 2 hours after the experiment, in the peritoneum of Guinea pigs injected with 1/2 c.c. of serum and 1/2 c.c. of culture.

In view of the negative results of these researches allied to those previously obtained in Africa (STOKES, BAUER and HUDSON, MATHIS and SELLARDS) as also in Brazil in man (GOMES DE FARIA, MARQUES DA CUNHA, OLYMPIO DA FONSECA, BORGES VIEIRA, BURLE DE FIGUEIREDO) we may conclude that the *Leptospira icteroides*, does not play any etiologic part in yellow fever. It is most probable the *Leptospira icteroides* appears in the cases in which it has been isolated, as a germ of secundary association, perhaps proceeding from the intestine of persons who ingest waters of bad quality and spoilt by *Leptospira*.

This hypothesis appears to us as being probable in view of the isolating, every time more and more frequent, of *Leptospiras*, pathogenic to Guinea pigs, directly from mine waters, pools, wells, etc. which renders it most probable, that such germs, being brought into the digestive tube through polluted waters, pass afterwards into the blood, in certain severe infectious cases like yellow fever.

As less probable would appear the hypothesis that, amongst the cases of yellow fever studied by NOGUCHI and his collaborators, there could exist some ones of the WEIL's disease, which would not have been identified and in which, he would have isolated the *Leptospira* which was that named *icteroides*.

IV

IDENTITY OF AFRICAN AND SOUTH AMERICAN YELLOW FEVER

The works realized between us during the actual epidemic of yellow

fever, under the most favourable conditions, enable us to leave aside, as. far as we many believe, the etiologic part of the *Leptospira icteroides* in yellow fever. Also, in Africa, the results in this respect, were absolutely negative, so that, we may conclude that no etiologic difference exists between the two diseases, either the one reigning in Africa or the other existing among us, both being caused by a still unknown virus.

The identity between both diseases, is, besides, thoroughly established, by its clinic aspects, anatomo-pathologic epidemiologic lesions, as also because both are practically caused by a unic transmissor, the *Aedes ægypti.*

The experiments effected here have shown that the *Macacus rhesus* was sensible to the American, in the same manner as to the African virus, which still firmer identifies both diseases.

To these proofs we may still add one more, this one being the cruised immunity between the African and the American virus.

Dr. CARLOS CHAGAS having brought from the Pasteur Institute, preserved in ice, fragments of liver from *rhesus* infected with African virus, this material was inoculated 20 days later to a *rhesus* and further to another one. The first monkey had a febrile reaction of 40º on the 5th day, and the second had no accentuated febrile reaction, the virus either having lost its virulence, or having such so attenuated as to be unable to cause the animal's death.

It thus gave way to suppose, that this virus, however attenuated, would be sufficient for conferring the *rhesus* immunity against the inoculation of an homologue virus. It was in fact, what was controlled, and the two above mentioned *Macacus rhesus*, being injected with an emulsion of liver of a *rhesus* infected with the virus isolated here, underwent no reaction, whereas a witness died within 7 days, which demonstrates that the first inoculation with the African material, however in attenuated form, was sufficient to protect it against our own virus, thus proving their identity.

V

ATTEMPTS TO OBTAIN A SEROROLOGIC DIAGNOSIS OF YELLOW FEVER.

A question of the highest importance in yellow fever is to succed in obtaining a sure method for its diagnosis, being given the high number of cases which evolve atypically, and of those which, owing to their benignancy do not differ from a common influenza and which for this reason and their infectiousity are more dangerous, under the hygienic point of view. Hence the interest there is in discovering them in time. For this purpose, we have tried, since the beginning of our researches about experimental yellow fever, to verify whether it could not bepossible to obtain a serologic diagnose of the illness, in making use of the fixation complement test.

Putting this method in practice, we used, in the beginning, as an antigen, the serum of patients in the 1st and 2nd days of the illness, at a dosis of 0.5 c.c. and, as an antibody, the serum of convalescents of 8 to 15 days, at a dosis of 0.2 to 0.5 c.c. The complement we used was that of Guinea pig and as a hemolytic system, we made use of rabbit anti-sheep serum and washed sheep's red cells.

The results of the experiments in 8 convalescent patients having been negative, we decided to substitute to the antigen, serum of a patient at the beginning of the disease, a phenicated extract of *rhesus* liver, prepared by emulsionating 5 grams of liver pulp, finely triturated, in 100 c.c. of saline solution, phenicated at 0,5%. The emulsion thus obtained was filtrated on paper, afterwards left to rest for a few days, being then controlled its preventive power. This antigen was used at a dosis of 0.2 to 0.4 c.c. with the same serums of convalescents as used in the former case, still not giving the least positive result.

The results got at till now in experiments by mean of deviation of complement have not been absolutely favourable, but it is possible that, using other technic methods, the viewed aim will be at last reached.

The serum of convalescent has no influence whatever on the WASSERMANN's reactions, which remain negative and as well at the beginning as during the convalescence of the illness, when syphilitic antecedents are not to be thought of, as we have been able to make certain in 8 cases we observed.

As an element for establishing a diagnosis of yellow fever, we can still avail ourselves, in certain cases, of the preventive properties acquired by serum from persons having recovered from the illness.

The serum of convalescent prevents easily the infection of the monkey, as demonstrated by STOKES, BAUER and HUDSON, whereas 2 c.c. serum of a normal man have no action whatever. Thus, as far as we shall be in presence of a case, suspected to be one of yellow fever, whose benignancy however, or the fact of having been seen rather late, did not allow a thorough diagnosis to be made, we can bring it into light in a rather easy way, searching the preventive properties of the serum. Take 2 c.c. of serum from the suspected person and inject it to a *Macacus rhesus*; 24 hours later, inoculate the same animal with a mortal dosis of virus, and if it does not contract the disease, this will mean that the serum is a preventive one, and there will be a high probability, if not a certainty, that the case was one of yellow fever; if, on the contrary, the animal gets ill, the case is to be considered as negative. This is a method to be experimented and which may lend useful services to the hygienist, explaining certain dubious cases, allowing the relation of some cases to others, and providing the hygienist with more precise epidemiologic data, a method of great advantage in certain cases.

This process was already used in three cases of a certain epidemiological importance in this city, being observed on two occasions, positive results together with the verification of the preventive properties of the serum from suspected persons, and in the third case, the proof was considered negative, showing plainly the suspicion of yellow fever was to be rejected, owing to the serum having protected the *rhesus* against the inoculation of the virus.

The results obtained in using this process of diagnose were of great usefulness for the epidemiologic works of the Public Health Department, for making clear the three cases above referred to.

VI

VACCINATION AGAINST YELLOW FEVER.

The vaccination against yellow fever, can be effected by two different methods, as well by way of passive immunisation through inoculation of serum from convalescents or from a monkey, immunized by repeated inoculations of virulent material, as by inoculating a vaccine prepared with blood or organs of infected monkeys.

We have used in many occasions, the serum from convalescents as a temporary protection method against the infection. It was at first used in Manguinhos to protect those working in the laboratories with infected monkeys and later on, its use was extended to people living amongst focii and to others who required a protection against any emergency. The number of such protected persons amounts to 50 or 60, all having well undergone the injections, which, only in one or another case, would cause a certain very short, quite individual depression. The serum used was that of persons who were with 15 days to one month recovering from mild and severe attacks of the illness. Between the persons thus protected against yellow fever, no case of the illness broke out up to this day, being used in same 1 to 2 c.c. serum, sub-cutaneously, as a vaccinating dosis.

The use of serum of convalescents is however a limited one, in view of the difficulties prevailing in getting it in big quantity allowing it to be used on a large scale.

We are immunising with blood and organs of infected *rhesus*, 1 horse and 2 sheep, 6 *rhesus* with a view to obtain in same, a serum having eventually a sufficient immunizing power, so as to be possibly advantageously used more extensively, in certain focii of the illness.

It is possible also that the serum of immunized animals whose preventive action has just been proved at the Pasteur Institute in Paris, may have also an efficient curing power in man, when used during the first days of the illness and in large quantities.

The vaccine against yellow fever, which is likely to obtain a big success, is obviously the one prepared with emulsion of organs of *Macacus rhesus* or *cynomolgus* and sterilized by either of the well known processes.

The French Commission of the Pasteur Institute had demonstrated that the warmed serum of a patient in the first days of the illness, when the virus is existing in him, had an obvious vaccinating power in relation to the yellow fever infection in man.

It was then to be expected that the organs of the *Macacus rhesus* or *cynomolgus* full with virus should offer more favourable conditions for preparing a vaccine, and, accordingly, since we infected the first *Macacus rhesus*, we used the organs of the animal to prepare it, reducing them to a pulp which, after being emulsified in sterilized water in the proportion of 1 to 9, was filtrated on gauze and sterilized by formol vapours, in accordance with the technic which has been in use amongst us since 1911 to sterilize the vaccine against fowl's spiroketosis.

The vaccine was already prepared and being tested in *rhesus*, and man, when we received HINDLE's work, giving an account of his interesting and precursory attempts with vaccines used by him against

yellow fever, one merely formolated, the other glycerinated and phenicated, using in both one part of liver against four of the sterilizing solute, in the first case formol at 1 o/oo and in the second a solute of 60o/o glycerine in phenicated water at 0.5o/o.

We decided then to prepare the glycerine and phenol vaccine, as recommended by HINDLE and to compare with another formolated 2 o/oo and phenicated at 0.5o/o with a view to obtain therewith a more perfect guaranty as to sterility as regards bacteria and fungi, without prejudice as to conservation of the virus. Both vaccines provided good results in the *rhesus*, protecting them against experimental infections and were, consequently, inoculated to man.

As the glycerinated vaccine would have shown more painful, we began to use in man, on a large scale the phenicated and formolated vaccine which is more easily borne, being hardly a little sensible at the moment of inoculating, and showing no posterior reaction.

The technic we nowadays apply to, for preparing the vaccine, is the following. We infect a sound *rhesus* or *cynomolgus*, with a doubtlessly mortal quantity of the virus, and when the animal, after having undergone the characteristical thermic rise, enters the stage of hypothermy, and sometimes even before this, it is then sacrificed by chloroform. The organs are immediately extracted with the maximum of asepsis, making use, for preparing the vaccine, of the liver, kidneys, spleen and brain, which are placed on large PETRI's dishes, sterilized and carefullv examined. As soon as they prove to be perfectly sound, they are washed in a saline solution, wiped on sterile filter paper and weighed.

Afterwards the organs are cut into small fragments which are placed into a mortar with sterile washed sand, being then triturated carefully. This being done, to one part of organ, are added 5 of distillated water, sterilized, formolated at 2 per o/oo and phenicated at 0.5o/o shaking and stirring off the material until a fine and homogeneous emulsion is got at, which then is filtrated on 4 leaves of gauze and collected into a sterile matrass. This filtrate is the vaccine which then is kept in the ice-box for 5 days, after which delay, its complete sterility is verified, which is obtained by inoculations into anaerobian and aerobian mediums, and consequent inoculation of 0.5 c.c. to two Guinea pigs.

Since the culture mediums remain sterile, the vaccine is then distributed into ampules with the usual care and inoculated anew. If its sterility is perfect and the Guinea pigs, after the due time, remain sound, the vaccine may be considered as fit and ready for use in man.

The dosis in which it is used in an adult man is 2 c.c. sub-cutaneously, care being taken however to shake the ampule to emulsify the material it contains, which deposits when not in use.

The formolated and phenicated vaccine, prepared as aforesaid, is a roseous yellowish liquid. trouble, giving a light deposit and without disagreeable smell, neither that of the formol nor of the phenic acid it contains.

This vaccine began to be used in the Oswaldo Cruz Institute between the people who deal there with yellow fever, and having shown no disagreeable reactions, began to be of common use, and the Public Health Department already received it, and is being using it widely, in small

isolated focii of yellow fever in the State of Rio de Janeiro, the total of vaccinated persons being already computed in more than three hundred. It was always easily borne. It did not give troublesome reactions, and amongst the vaccinated people, there has been no case of yellow fever. However, as the question has been dealt with in a small scale only, and not richly observed, there is no possibility, for the time being, to make oneself a definite opinion at this respect.

Presently, about 2 thousand dosis are ready for experiments to be undertaken by the Public Health Department.

With our pursuance of Laboratory experiments with this vaccine, and its being used practically on a large scale, we may nourish the hope of reaching, in an early time, to positive and definite results as to its practical advantages, time of keeping, duration of the immunization, etc.

These are, here resumed, the results which up to this day, we have obtained from our researches, on yellow fever in Rio de Janeiro.

Notas sobre a Febre Amarella

Pelos Drs. A. MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ.

O apparecimento de alguns casos de febre amarella, no Rio de Janeiro, deu occasião a que fizessemos algumas pesquisas sobre o assumpto.

O fim da presente nota é relatar os primeiros resultados desses estudos.

Dividiremos este trabalho em duas partes, na primeira relataremos os ensaios tendentes a isolar a *Leptospira icteroides* de doentes de febre amarella, tentativas essas de resultados inteiramente negativos.

Na segunda parte, trataremos da transmissão da molestia a animaes de experiencia, no caso em questão representados pelo *Macacus rhesus*, cuja receptividade para a febre amarella foi demonstrada na Africa, por STOKES, BAUER e HUDSON. Empregamos tambem uma vez em nossas experiencias o *Macacus cynomolgus* que tambem se mostrou sensivel, conforme havia verificado o Dr. HENRIQUE ARAGÃO.

PESQUISA DA *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*.

A pesquisa da *Leptospira icteroides* foi feita não só encarando esse microorganismo como possivel agente da doença mas tambem admittindo a hypothese formulada por SCHÜFFNER de considerar a *Leptospira* um germen de invasão secundaria. Por isso, as nossas pesquisas foram feitas não só no periodo em que o sangue é infectante, mas tambem em estadios adiantados da molestia em que a presença no meio circulante de microorganismos de invasão secundaria deveria ser mais provavel.

Empregámos em nossas tentativas sangue retirado em varias phases da molestia, desde o primeiro dia até o periodo agonico. O sangue era retirado e collocado em tubos contendo solução physiologica citratada a 2%. Muitas vezes a sementeira era feita logo após a retirada e outras após algumas horas de permanencia na geladeira á temperatura de 5º a 10ºC. Semeámos ora somente plasma, ora sangue total. De cada amostra de sangue semeavamos nunca menos de seis tubos de cultura e cada um delles com quantidades que variavam desde uma gotta até 2 a 3 c.c. Sempre empregámos o meio de NOGUCHI para *Leptospira*, tendo semeado algumas vezes alem do meio em questão, variantes desse meio taes como meio de NOGUCHI para *Leptospira* com camada de paraffina, o mesmo meio com um tragmento de orgão fresco de coelho. Tambem semeámos tubos com liquido de RINGER e ascite e tubos com sôro de coelho diluido em agua physiologica na proporção de $^1/_3$, $^1/_{15}$ e $^1/_{30}$.

As culturas eram conservadas á temperatura ambiente e observadas pelo espaço minimo de um mez. Todas as culturas que durante esse prazo apresentavam qualquer turvação, eram cuidadosamente examinadas em campo escuro. Nessas condições foram examinados sangues de 13 doentes, sendo alguns delles mais de uma vez em periodos differentes da evolução

da molestia. Os resultados com o fito de cultivar a *Leptospira icteroides* foram sempre negativos.

Com o sangue de alguns desses doentes foram inoculadas cobayas, por via intraperitoneal. Com o sangue, rim e figado dessas cobayas, foram feitas passagens para uma segunda serie de cobayas, as quaes serviram para fornecer material para uma terceira passagem. Com o sangue dos animaes dessas tres series, foram feitas sementeiras em meio de NOGUCHI para *Leptospira*. Os orgãos (figado, rim e capsula suprarenal) desses animaes foram examinados em campo escuro e após impregnação.

Tambem inoculámos cobayas com visceras (figado e rim) provenientes de autopsias de alguns casos de febre amarella, bem como com urina retirada do cadaver. Todos esses exames foram improficuos para evidenciar a presença de *Leptospira*.

TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELLA AO *MACACUS RHESUS*.

A primeira tentativa que fizemos para obter a infecção de *Macacus rhesus*, com sangue de amarellento, foi feita depois de decorrido algum tempo do apparecimento da molestia entre nós, pois no inicio de nossas pesquisas não dispunhamos desses animaes. Sómente mais de um mez após o apparecimento dos primeiros casos, foi que podemos realizar a primeira tentativa nesse sentido. Inoculámos então um *rhesus*, por via intraperitonial com sangue de um caso benigno, com cerca de 24 horas de molestia, o doente H. M., recolhido ao hospital annexo ao Instituto Oswaldo Cruz. O animal inoculado apresentou no 6º dia após a inoculação temperatura elevada de (40º) que baixou no dia seguinte. Passados alguns dias, observou-se nova elevação thermica depois da qual a temperatura se normalizou, nada mais apresentando o animal até agora.

Mais tarde inoculámos outro *rhesus* com o sangue do doente F. W., tambem recolhido ao hospital do Instituto Oswaldo Cruz. Esse doente apresentava tambem uma forma benigna da molestia. O sangue foi retirado cerca de 48 horas após o apparecimento dos primeiros symptomas e injectado no *rhesus* n. 6, por via intraperitonial. A temperatura do animal, tomada diariamente á tarde (graphico n. 1), manteve-se sem alteração oscillando entre 38,1 a 39,1 até o 10º dia em que se elevou a 39,7. A temperatura tomada no dia seguinte pela manhã (10 horas), era de 39,6. Duas horas depois a temperatura havia cahido a 38º. O animal foi então sacrificado e autopsiado. A urina retirada da necropsia apresentava-se de côr amarella e continha albumina e cylindros. O figado ao exame histologico apresentava lesões embora pouco extensas, semelhantes ás descriptas por STOKES, BAUER e HUDSON, taes como necrose, degeneração gordurosa e infiltração de polynucleares.

Com o figado desse macaco, conservado quatro dias na geladeira, foi inoculado um outro *rhesus* n. 8 cuja curva thermica se encontra no graphico n. 2. No 8º dia após a inoculação a temperatura, depois de ter apresentado pequenas elevações de 39,5 e 39,3, nos dias anteriores, era pela manhã de 37,6 (8,40 horas). As 13 horas a temperatura tinha cahido a 35,2 sendo então o animal sacrificado e autopsiado.

O exame histopathologico do figado não revelou aqui as lesões typicas conforme descreveram STOKES, BAUER e HUDSON, pois não

havia necrose das cellulas hepaticas ou se existia, era tão rara, que não poude ser encontrada pelo exame de alguns córtes. Havia além de degeneração gordurosa e infiltração de polynucleares, certas alterações da estructura nuclear, cujo estudo detalhado será feito pelo Dr. MAGARINOS TORRES.

O figado desse animal, conservado seis dias na geleira, injectado no *Rhesus* n. 14, deu logar a uma infecção com curva thermica habitualmente encontrada nesses animaes, como se vê no graphico n. 3. Esse animal apresentou no 6º dia quéda brusca de temperatura sendo então sacrificado. A autopsia revelou os signaes geralmente observados na febre amarella experimental, sendo que pelo exame histopathologico, se poude evidenciar a presença, embora pouco extensa, das lesões typicas de STOKES, BAUER e HUDSON acima referidas.

Posteriormente foram inoculados outros animaes, perfazendo até a presente data, 8 passagens successivas do virus. Nessas passagens temos empregado geralmente figado triturado com agua physiologica, filtrado em tella metallica e injectado por via sub-cutanea. Duas vezes empregámos sangue por via intraperitoneal, sendo que em uma dellas o sangue foi retirado na autopsia e inoculado em um *cynomolgus* que veio a morrer 14 dias após a inoculação. Outra vez, foi o sangue retirado em vida do animal, em periodo febril, dois dias antes de sacrificado (o sangue provinha do *rhesus* n. 14, cuja temperatura era na occasião de 40,5). O animal inoculado, *rhesus* n. 16, teve uma infecção com quéda brusca da temperatura no 6º dia. Em vista desses resultados, pensamos que para a passagem do virus se deve empregar de preferencia ou figado ou sangue, retirado em vida do animal, em periodo febril.

Queremos agora chamar a attenção para alguns factos que observámos no decurso de nossas pesquisas.

O primeiro facto se refere á febre. Em alguns dos animaes a temperatura maxima observada no decurso da infecção foi pouco elevada (39,7 no *rhesus* n. 6; 39,5 no *rhesus* n. 8; 39,3 no *rhesus* n. 16). Se adoptassemos o criterio da commissão constituida por STOKES, BAUER e HUDSON que sómente considera febre uma temperatura de 40º ou mais, esses animaes não teriam apresentado febre. Si porém compararmos essas temperaturas com as observadas anteriormente no mesmo animal, veremos que houve nitida elevação thermica. O que acabamos de affirmar resalta claramente do exame do graphico das temperaturas do *rhesus* n. 16, que embora apresentando uma temperatura maxima pouco elevada, 39,3, mostra sobre as temperaturas anteriores de 37,6 e 37,8 elevação bem nitida de 1,5. Assim pensamos que constitue melhor criterio para se saber se houve ou não febre no curso da infecção, a verificação de elevações da temperatura em relação ás tempeturas observadas anteriormente, no mesmo animal e não em relação a um limite determinado e invariavel para todos os animaes.

Outro facto da maior importancia se refere ás lesões observadas. Assim no *rhesus* n. 8, inoculado com figado do *rhesus* n. 6 que apresentava lesões typicas, embora pouco extensas, não havia no figado as lesões descriptas por STOKES, BAUER e HUDSON na Africa, pois não havia necrose das cellulas hepaticas. Desta forma, pelas lesões observadas no figado e de accordo com o que estabeleceu a esse respeito a commissão acima re-

ferida, não era possivel pelo exame histopathologico do figado fazer o diagnostico de febre amarella. O figado desse macaco inoculado no *rhesus* n. 14, deu logar a uma infecção com todas as caracteristicas da doença experimental, inclusive as lesões histopathologicas do figado, demonstrando assim, que o *rhesus* n. 8 estava effectivamente infectado com febre amarella.

Este facto se repetiu posteriormente em outro animal, o *rhesus* n. 19, de uma maneira ainda mais digna de nota.

Nesse caso, quasi todas as lesões geralmente encontradas e descriptas até então como caracteristicas da febre amarella experimental, faltavam completamente, existindo apenas infiltração gordurosa periporta. Nem mesmo as alterações da estructura nuclear observadas no *rhesus* n. 8, poderam ser encontradas aqui. Entretanto o figado desse animal, ao contrario do que era de esperar, reproduziu, quando inoculado no *rhesus* n. 22, uma infecção com todos os caracteres da febre amarella experimental, inclusive as lesões do figado, (necrose das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa, infiltração de polynucleares, etc.). Convem assignalar que o *rhesus* n. 19 foi sacrificado no 5º dia após a inoculação depois de ter apresentado elevação de temperatura no 2º e no 4º dia. A temperatura era, no momento em que o animal foi sacrificado, de 38,8, isto é, mais ou menos normal, não tendo o animal apresentado o periodo de hypothermia observado em outros casos.

Assim, embora reconhecendo a importancia das lesões do figado na caracterisação da febre amarella experimental, podemos affirmar que a ausencia dellas não exclue a possibilidade da infecção do animal. Os dois casos acima citados, verificados em nossa serie de inoculações, fornece prova cabal desse facto.

Notes about Yellow Fever.

By Drs. A. MARQUES DA CUNHA and JULIO MUNIZ.

The occurrence of a few cases of yellow fever in Rio de Janeiro, gave us an opportunity to effect some researches about this disease. The object of the present note is to report upon the first results of these researches.

We shall divide our work into two parts. In the first we shall relate our attempts with a view to isolating the "*Leptospira icteroides*" from yellow fever patients, which attempts have led to absolutely negative results. In the second part, we shall deal with the transmission of the disease to experimental animals, represented, in the present case, by the *Macacus rhesus*, whose receptivity for Yellow Fever has been demonstrated in Africa by STOKES, BAUER and HUDSON. We made use also once, in our experiments, of the *Macacus cynomolgus* which alike proved sensible, according to Dr. B. ARAGÃO's verification.

RESEARCH OF THE "*LEPTOSPIRA ICTEROIDES*".

We undertook searching the *Leptospira icteroides* not only for considering this micro organism as a possible factor of the disease, but also under the hypothesis, expressed by SCHUFFNER the *Leptospira* might represent a germ of secondary invasion. For this reason, our research were effected, not merely during the period in which blood is likely to infect, but also during advanced stages of the illness in which the presence in the blood of micro organisms of secondary invasion should appear as more likely to exist.

We used, for our attempts, blood extracted during various stages of the illness, since the first day up to the agonial period. The blood was extracted and placed into tubes containing a physiologic citrated 2% solution. Very often, the sowing was effected immediately after extracting the blood. Other ones were made after a few hours cooling on icebox at the temperature of 5 to 10°. We sowed, at times plasma only, at other times total blood. Of each sample of blood we never used to sow less than six tubes of culture, each of these with quantities varying from one drop to 2 and 3 ccm. The medium we always used was a medium of NOGUCHI for *Leptospira*, having sometimes sowed, besides the medium referred to, variants of this medium, such as NOGUCHI's for *Leptospira* with a coating of paraffin, the same medium with a fragment of fresh blood organ. We also sowed tubes with RINGER and ascite's liquide as also tubes with rabbit serum, diluated in saline solution in the proportion of 1/3, 1/5 and 1/30.

The cultures were kept at the room temperature and observed for a period of not less than a month. All the cultures, which during this delay, would present any cloudiness, were carefully examined in dark field. Under these conditions, we examined bloods of 13 patients, some of which, more

than once, were at different stages of the illness. The results, as to trying to cultivate the *Leptospira icteroides*, remained always negative.

With the blood of some of these patients, we effected intra peritoneal inoculations in Guinea pigs. With the blood, kidney and liver of those Guinea pigs, we made passages to another series of Guinea pigs, which were used to provide material for a third passage. With the blood of the animals of these three lots, we made sowings in NOGUCHI's medium for *Leptospira*. The organs (liver, kidney and adrenals) were examined in dark field after impregnation.

We also inoculated Guinea pigs with viscera (liver and kidney) obtained from autopsies of a few cases of yellow fever as well as with urine extracted from the corpse. All these examinations were of no profit to make the presence of *Leptospira* obvious.

TRANSMISSION OF THE YELLOW FEVER TO THE *MACACUS RHESUS*.

The first attempt we made to obtain the infection of *Macacus rhesus* with blood of yellow fever patients was effected only after some times had elapsed since the illness appeared amongst us, for, at the beginning of our researches, we could not dispose of such animals. It was only more than one month after the first case broke out, that we were able to realize our first attempt in this way. We inoculated then, by via intraperitoneal, a *rhesus* with the blood of a benign case of about 24 hours duration The patient was H. M., admitted at the Hospital annexed to the Oswaldo Cruz Institute. This animal showed on the 6th day after the inoculation, a high temperature (40°) which dropped on the following day.

A few days later we observed a new thermic rise, after which the temperature grew normal again, and the animal did not show any more troubles, till now.

Later we inoculated another *rhesus* with the blood of the patient F. W. also admitted at the Hospital of the Oswaldo Cruz Institute. This patient showed also a mild form of the disease. The blood was extracted about 48 hours after appearing the first symptoms, and injected per via intraperitoneal to the *rhesus* monkey n. 6. The temperature of the animal, taken every day at evening (diagram n. 1) went on without change, oscillating between 38.1 and 39.1 until on the 10th day, it grew to 39,7. The temperature taken on the next morning (10 A. M.) was 39,6. The hours later, the temperature had fallen to 38°. The animal was then killed and autopsied. The urina extracted in the necropsy proved to be yellow containing albumin and cylinders. The histological examination of the liver, revealed lesions, notwithstanding of not a large extent similar to those described by STOKES, BAUER and HUDSON: necrosis, fatty degeneration, and polynuclear infiltration.

With the liver of that monkey preserved in icebox for 4 days, another *rhesus* n. 8 was inoculated whose thermic curve is shown in graphic n. 2. On the 8th day after the inoculation, the temperature, after having shown feeble rises of 39.5 and 39.3 in the course of the two days before, was in the morning 37.6 (8.40 A. M.). At 13 o'clocks the temperature had dropped to 35,2 being then the animal sacrificed and autopsied.

The histopathologic examination of the liver did not reveal the typical lesions as described by STOKES, BAUER and HUDSON, for there was no necrosis of the hepathic cells, or if any, it was so scarce as not to be seen in examining several sections. There was, beside the fatty degeneration and polynuclear infiltration, certain alterations in the nuclear structure, a detailed study of which will be made by Dr. MAGARINOS TORRES.

The liver of this animal kept in icebox for 6 days, and injected to *rhesus* n. 14, gave way to an infection with thermic curve, as usually found in these animals, which graphic n. 3 shows. This animal presented on the 6th day, a sudden drop of temperature, after which it was sacrificed. The autopsy revealed signs as generally observed in experimental yellow fever, viz. in the histopathologic examination the presence, though on a very small scale of the typical STOKES, BAUER and HUDSON lesions, necrosis, fatty degeneration and polymorphonuclear infiltration could be made patent.

Later on, other animals were inoculated totalizing to this date, 8 successive passages of virus. In these passages, we generally used liver stuff, finely triturated with saline solution, filtrated on wire cloth and injected subcutaneously. We used twice blood per via intraperitoneal, once being blood extracted after autopsy and inoculated to a *cynomolgus* which happened to die 14 days after the inoculation. The second time, we used blood extracted alive, from the animal in the febrile stage two days before being sacrificed. The blood proceded from the *rhesus* n. 14, whose temperature, was by the time, 40.5º. The inoculated animal, *rhesus* n. 16, had an infection with sudden drop of temperature on the 6th day. In view of such results, we are of opinion that, for passing the virus, either liver or blood extracted alive from the animal in the febrile stage has to be preferred.

We should like to call now attention to snme facts observed by us in the course of our researches.

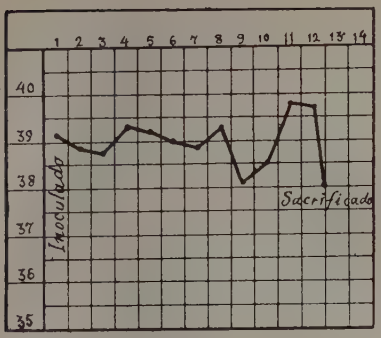
The first refers to fever. In some of the animals, the maximum temperature observed in the course of the disease, was not a high one (39.7 in *rhesus* n. 6, 39.5 in *rhesus* n. 8 and 39.3 in *rhesus* n. 16). Should we adopt the criterium of STOKES, BAUER and HUDSON who only consider a fever, a temperature of 40º and upwards, then these animals would not have shown fever whatever. If however, we compare these temperatures with those observed formerly in the same animal, we shall see there has been an obvious thermic rise. What we just affirmed goes out clearly examining the temperature graphics of *rhesus* n. 16, which in spite of not showing a little elevated maximum temperature, 39.3, points out, on the former temperatures of 37.6 and 37.8 a plain increase of 1.5º. Accordingly, we think verifying temperature rises in comparizon with former temperature observated in the same animal, but not in relation with a determined unvarying limit for all the animals, constitutes a better criterium to know whether or not there was a fever in the course of the infection.

Another fact of higher importance refers to the observed lesions. Thus, in *rhesus* n. 8, inoculated with liver from *rhesus* n. 6, which showed typical lesions, even if to a small extent. there were in the liver, none of

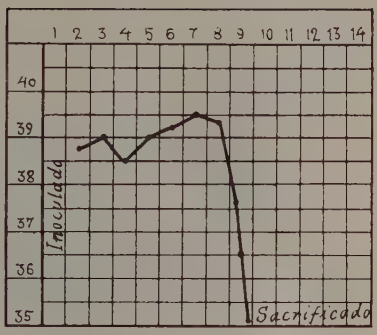
the lesions as discribed by STOKES, BAUER an HUDSON in Africa, while there was no necrosis of the hepathic cells. In this way, from the lesions observed in the liver, and according to what was established on this subject by the Commission above referred to, it was not possible, after histopathologic examination of the liver, to make a diagnosis of yellow fever. The liver of this infected monkey, inoculated to *rhesus* n. 14 gave way to an infection with all the characteristics of the experimental disease, including the histopathologic lesions of the liver, thus demonstrating that *rhesus* n. 8 was in a fact infected by yellow fever.

This fact occurred anew later on, in another animal, *rhesus* n. 19, in a still more noteworthy manner. In that case, almost all the lesions generally found and described up to now, as characteristics of experimental yellow fever would miss completely, hardly existing periportal fatty infiltration. Nor even could be found there the alteration of the nuclear structure observed in *rhesus* n. 8, meantime, the liver of that animal against any expectation, reproduced, when inoculated to *rhesus* n. 22, an infection with all the characters of experimental yellow fever, including the liver lesions, necrosis of hepathic cells, fatty degeneration, polynuclear infiltration, etc. We must point out that the *rhesus* n. 14 was sacrificed on the 5th day posterior to the inoculation, after having shown temperature rise on the 2nd and 4th days. The temperature was, by the time the animal was killed, 38.8 i, e, more or less normal, the animal having hundergone no hypothermic period, as observed in other cases.

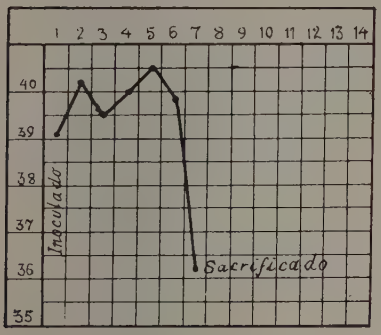
Thus, though we acknowledge the importance of the liver lesions in characterizing experimental yellow fever, we may affirm that the missing of same does not elude the possibility of infection of the animal. The two above stated cases, controlled in our series of inoculations furnished a formal proof thereof.



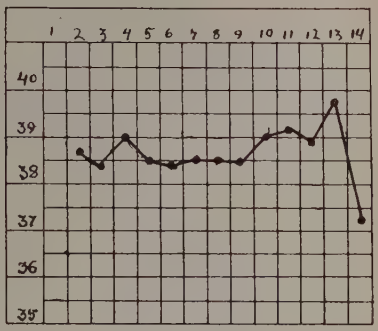
N. 1—*Rhesus 6*



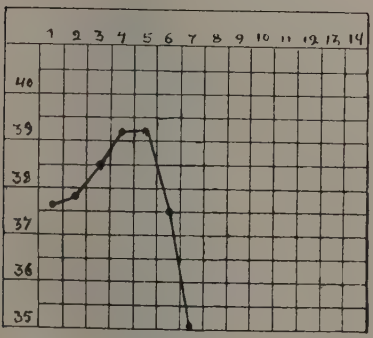
N 2—*Rhesus 8*



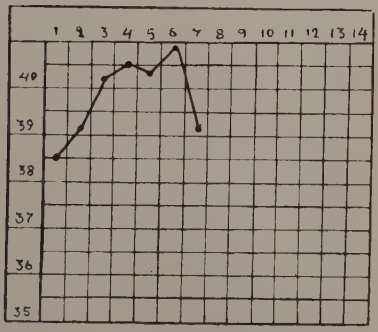
N. 3—*Rhesus 14*



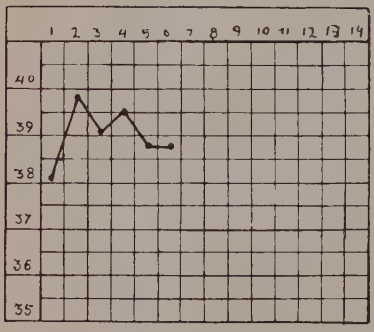
N. 4—*Cynomolgus 15*



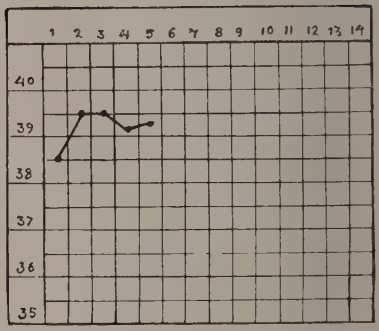
N. 5—*Rhesus 16*



N. 6—*Rhesus 17*



N. 7—*Rhesus 19*



N. 8 *Rhesus 22*

Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de MACACUS RHESUS e M. CYNOMOLGUS pelo virus da febre amarella.

Pelo Dr. C. MAGARINOS TORRES.

Examinando, a pedido dos Drs. BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ, material histologico proveniente de diversos *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus*, a maioria inoculados com o virus da febre amarella, outros não inoculados e mortos de tuberculose e causas não esclarecidas, fomos levados a confirmar as verificações daquelles pesquizadores no que diz respeito aos seguintes pontos: 1º.—A inoculação de sangue de casos benignos de febre amarella nos primeiros dias de molestia, ou de *Aedes ægypti* infectados reproduz em *M. rhesus* as lesões obtidas por STOKES, BAUER e HUDSON, pela inoculação do virus africano (ARAGÃO); 2º.—Outras vezes, as lesões produzidas no figado, embora da mesma natureza das mencionadas pela Commissão Americana, offerecem menor intensidade, acontecendo que, pela passagem em serie, em *M. rhesus*, ellas podem apresentar uma notavel variabilidade, especialmente no que respeita á degeneração gordurosa e necrose das cellulas hepaticas; em duas occasiões foi mesmo possivel observar inteira auzencia das lesões mencionadas pela Commissão Americana em figados capazes, no entanto, de reproduzir, na passagem seguinte, aquellas alterações (CUNHA e MUNIZ).

Particularmente difficil tornou-se assim, por vezes, a interpretação do exame histo-pathologico justamente na questão que mais interessava ao investigador que era a de decidir se o animal apresentava ou não as lesões da febre amarella experimental.

Em *M. rhesus* que, inoculados com o virus da febre amarella, morreram com symptomas e lesões semelhantes aos descriptos por STOKES, BAUER e HUDSON, verificámos ao lado das "lesões typicas" daquelles auctores, alterações nucleares da cellula hepatica, da mesma natureza das descriptas em certas doenças causadas por virus filtraveis (herpes, varicella, virus III do coelho) ora sob o nome de "inclusões acidophilas intranucleares", ora sob o de "degeneração oxychromatica".

Tendo já analysado detalhadamente, em outro lugar, o referido processo, nos limitamos aqui a reproduzir uma estampa colorida na qual procurámos dispor as diversas phases do processo, de accordo com a sua provavel seriação. Accentuaremos apenas aqui que, as figuras *g* e *h*, (Est. colorida) pela sua abundancia relativa e configuração caracteristica, facilitam o reconhecimento do processo, não tendo, afóra isso importancia especial; estudos posteriores, tambem, nos mostraram que, em alguns casos, o nucleolo apparece perfeitamente distincto da substancia acidophila intranuclear que se accumula na porção central do nucleo a qual assim, se origina independentemente de substancias nucleolares.

Completamos a documentação com duas microphotographias, feitas com identica ampliação, uma de figado de *M. rhesus* não inoculado e cujos

nucleos mostram estructura conservada; outra de um figado de *M. rhesus* inoculado com o virus da febre amarella e na qual qnasi todas as cellulas mostram a alteração mencionada.

Bem caracterisada a "degeneração oxychromatica" das cellulas do figado nos animaes inoculados com virus, e conhecida as relações desse processo com determinadas doenças causadas por virus filtraveis, algumas questões logo surgiam cuja solução offerecia bastante interesse.

Seria a degeneração oxychromatica da cellula hepatica uma alteração cellular banal e commum, comparavel assim á degeneração gordurosa, á necrobiose daquelle elemento, processos estes ultimos, que são assaz frequentes não só em *M. rhesus* inoculados com virus amarillico, como nos mortos de tuberculose e de causas obscuras e tambem em outros macacos inoculados com diversos organismos (*Cebus macrocephalus* inoculados com *Leptospira icteroides* - MULLER, NOGUCHI), ou seria ella uma alteração peculiar á infecção pelo virus da febre amarella?

A resposta aqui depende, naturalmente, de um modo estreito, do numero do *M. rhesus* não inoculados e submettidos ao exame histo-pathologico. Quanto maior elle fôr, tanto mais segura a conclusão.

Até o presente momento não conseguimos encontrar a degeneração oxychromatica senão em *M. rhesus* inoculados com o virus, embora os não inoculados que examinámos apresentassem alterações cellulares de natureza variada, taes como degeneração gordurosa, necrose e necrobiose. Assim sendo, devemos responder que, baseados em verificações feitas até o momento, a degeneração oxychromatica da cellula hepatica constitue uma alteração cellular encontrada unicamente em macacos inoculados com o virus da febre amarella e sob esse ponto de vista pode ser tida como uma lesão caracteristica do figado na febre amarella experimental, não tendo relação com outras alterações cellulares communs.

Outra questão era estabelecer qual o valor da degeneração oxychromatica como lesão capaz de autorizar um diagnostico positivo de infecção na febre amarella experimental no decurso de experimentações com o virus.

Que um tal diagnostico offerece reaes difficuldades se quizermos baseal-o, unicamente, em dados histo-pathologicos, ficou atraz claramente indicado; a razão está na grande variabilidade das lesões de animal para animal, no papel importante que podem ter factores subjectivos na analyse histo-pathologica e ainda no facto de lesões hepaticas até agora ahi assignaladas, taes a degeneração gordurosa, necrose e necrobiose, não serem lesões de modo algum especificas da infecção pelo virus amarillico.

É claro que se a degeneração oxychromatica constituisse um processo, embora especifico, mas evidenciavel com difficuldade ou de modo inconstante, ficaria logo prejudicada a ideia de aproveital-a sob esse ponto de vista.

Mas tal não succede, e a fig. 2 documenta de modo cabal, a intensidade que algumas vezes ella possue nas infecções pelo virus brasileiro.

Na nossa opinião, a degeneração oxychromatica constitue um dos melhores criterios para decidir se o *M. rhesus* apresenta ou não lesões attribuiveis ao virus da febre amarella, desde que sejam feitas certas reservas que decorrem das considerações que passamos a analysar.

Não pudemos, ainda, realizar o estudo systhematisado das lesões nucleares, sacrificando o animal inoculado em phases da evolução da doença experimental que julgassemos mais opportunas; aproveitámos, apenas, o material de BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ, obtido no decurso de pesquizas que tinham um objectivo diverso. Comtudo já alguma coisa podemos adiantar pelo estudo desse material.

Assim, a degeneração oxychromatica existia em quatro *M. rhesus* sacrificados no quinto dia de inoculação com figado contendo virus, faltando em um outro, sacrificado com o mesmo prazo de infecção; era presente em quatro animaes sacrificados no sexto dia, em um *M. cynomolgus* sacrificado no setimo dia, em um *M. rhesus* no oitavo dia, em um no nono dia, em dois no decimo dia, em um no decimo primeiro dia, em um *M. cynomolgus* no decimo quarto dia e em um *M. rhesus* sacrificado no decimo quinto dia. Não mais a encontrámos em um *M. rhesus* que, sobrevivendo, foi sacrificado no decimo nono dia.

Quanto á intensidade ou á facilidade com que era encontrada, temos a informar que se apresentava extraordinariamente abundante em dois *M. rhesus* sacrificados no 6º dia, um inoculado com sangue, outro com figado de macaco contendo virus, ainda em um sacrificado no 8º e em dois outros sacrificados no 10º dia, um dos quaes fôra inoculado com *Aedes ægypti* infectados (v. a fig. 2).

Em quatro *M. rhesus* sacrificados no quinto dia, em um *M. cynomolgus* sacrificado no setimo dia, em um *M. rhesus* sacrificado no nono dia e em um outro sacrificado no decimo primeiro, a degeneração oxychromatica era bastante abundante, sendo facilmente encontrada nos córtes histologicos.

Em dois *M. rhesus* sacrificados no sexto dia, e em um *M. cynomolgus* sacrificado no decimo quarto dia, ella era discreta.

Finalmente, em um *M. rhesus* morto no decimo quinto dia, ella era encontrada com difficuldade.

Em relação á sua constancia nos animaes inoculados, as nossas observações não foram ainda realisadas de modo satisfactorio, visto como dependem, necessariamente, da collaboração effectiva dos pesquizadores que trabalham com o virus e assim, só mais tarde, poderão ser levadas a effeito.

Examinando porém, juntamente com CUNHA e MUNIZ, uma serie de inoculações em *M. rhesus*, confirmamos as suas verificações a respeito da variabilidade das lesões hepaticas e da auzencia das descriptas como typicas por STOKES, BAUER e HUDSON, em macacos (2ª. e 5ª. passagens) cujo figado, no entanto, continha o virus conforme mostraram os symptomas e as lesões em animaes inoculados posteriormente.

Em um dos animaes (2ª. passagem), a degeneração oxychromatica foi a unica lesão da cellula hepatica verificada, sendo ahi, bastante intensa: em um outro (5ª. passagem), ella mesma não poude ser reconhecida mostrando o figado apenas discreta infiltração gordurosa periporta.

RESUMO E CONCLUSÕES.

No figado de um *Macacus rhesus* inoculado por BEAUREPAIRE

ARAGÃO com sangue de um caso benigno de febre amarella e no qual elle descreveu symptomas e lesões typicas semelhantes ás obtidas por STOKES, BAUER e HUDSON pela inoculação com o virus africano no mesmo animal, encontrámos alterações nucleares da mesma natureza das assignaladas no herpes zoster, herpes symptomatico, varicella e virus III do coelho e descriptas ora sob o nome de "inclusões acidophilas intranucleares" (LIPSCHÜTZ, GOODPASTURE), ora sob o de "degeneração oxychromatica" (LAUDA e LUGER).

Alterações nucleares semelhantes da cellula hepatica encontrámos, posteriormente em 13 *M. rhesus* e 2 *M. cynomolgus* inoculados com o virus brasileiro da febre amarella o qual fôra isolado independentemente por BEAUREPAIRE ARAGÃO e depois por A. MARQUES DA CUNHA e J. MUNIZ de dois casos benignos de febre amarella, tendo sido um dos macacos injectado directamente com o sangue do doente; dois macacos foram inoculados com *Aedes ægypti* infectados em homem e em macaco; os demais foram animaes empregados em passagens em serie do virus pelo macaco, e talvez esse facto explique até certo ponto, as notaveis differenças por vezes encontradas nas alterações histopathologicas do figado, visto como, em condições naturaes, o virus nunca passa directamente de homem para homem.

A intensidade com que se apresenta a degeneração oxychromatica de modo algum está na dependencia das alterações do conteúdo gorduroso, necrose e necrobiose encontradas; em um caso, ella era a unica alteração presente no figado, sendo então particularmente intensa.

As inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica) não foram encontradas em diversos *M. rhesus* não inoculados e mortos por causas obscuras; no entanto, em taes figados eram presentes infiltração e degeneração gordurosas associadas a alterações de necrose e necrobiose.

Alguns estadios (figuras intranucleares "em borboleta" e "em ameba", v. fig. *g* e *h*, Est. colorida) sendo abundantes, facilitam, em virtude de sua configuração especial, o reconhecimento da degeneração oxychromatica em córtes feitos segundo uma technica rapida (pequenos fragmentos de figado fixados em formol aquecido a 60ºC.—trinta minutos, córtes em congelação, hematoxylina, eosina, alcool absoluto, phenol-xylol-creosoto, xylol, balsamo), não tendo, afóra isso, importancia especial.

Ao passo que a degeneração e infiltração gordurosa, bem como a necrose e a necrobiose da cellula hepatica apresentam variações consideraveis em sua intensidade de um para outro animal em uma passagem em serie não interrompida do virus pelo *M. rhesus*, chegando mesmo a faltar inteiramente em dois animaes cujo figado, no entanto, mostrou-se capaz de reproduzir symptomas e lesões typicas na passagem seguinte, as inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica), de regra, se encontram com muito maior regularidade. Em dois *M. rhesus* mortos no 6º dia, em um no 8º e em dois no 10º dia, a degeneração oxychromatica era de tal modo abundante que quasi todas as cellulas do figado se mostravam attingidas (v. fig. 2); em um delles, conforme atraz ficou dito, sendo bastante intensa, era a unica alteração encontrada no figado.

Em *M. rhesus* mortos no 14º e no 15º dias de inoculação, a dege-

neração oxychromatica era escassa, mostrando-se inteiramente auzente em um outro morto no 19º dia.

Apparentemente occorre, assim, uma desapparição gradual das inclusões acidophilas intranucleares das cellulas hepaticas depois de ahi terem sido muito abundantes, em alguns casos, no 10º dia (v. fig. 2). No entanto, a degeneração gordurosa e a necrose podem persistir, sendo, de facto ainda intensas em um macaco morto no 15º dia, e no qual a degeneração oxychromatica, mostrava-se, comtudo, assaz escassa.

Em um macaco morto no 5º dia, o qual transmittio o virus a um outro animal, não foi encontrada degeneração oxychromatica no figado, sendo uma ligeira infiltração gordurosa periporta a unica lesão ahi existente; a degeneração oxychromatica, no entanto, reappareceu no animal inoculado em seguida.

Levando em conta que, algumas vezes, na passagem em serie não interrompida do virus da febre amarella pelo *M. rhesus*, o figado pode apresentar uma apparencia normal, que as alterações histopathologicas são muito variaveis em intensidade de um animal para outro e que a intensidade com que se apresenta a degenaração oxychromatica varia conforme o dia de inoculação em que morre o animal, as inclusões acidophilas intranucleares são, na nossa opinião, mais capazes de assegurar o diagnostico histopathologico da doença provocada no *M. rhesus* de que qualquer outra alteração anteriormente ahi assignalada.

As verificações effectuadas não contradizem a hypothese de que as inclusões acidophilas intranucleares estejam associadas á presença do virus no interior das cellulas affectadas, de accordo com o que muitos auctores affirmam em relação a outras doenças produzidas por virus filtraveis onde existem alterações nucleares semelhantes (herpes zoster, herpes symptomatico, varicella, virus III do coelho).

Admittindo-a, facil se torna explicar a apparente independencia entre degeneração oxychromatica e degeneração gordurosa, necrose e necrobiose no figado: as primeiras são devidas á presença e talvez, multiplicação do virus no interior das proprias cellulas, as segundas se achando antes na dependencia de uma toxemia concomitante.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

In the liver of one *Macacus rhesus* injected by BEAUREPAIRE ARAGÃO with blood of one benign case of yellow fever and in which he described (1) symptoms and typical lesions similar to those obtained by STOKES, BAUER and HUDSON in *M. rhesus* injected with the African virus, it has been found (2) changes in the nuclei analogous to those refered to in herpes zoster, symptomatic herpes, varicella and virus III infection of rabbits, and described either under the name of "acidophilic intranuclear inclusions" (LIPSCHÜTZ, GOODPASTURE), either as "oxychromatic degeneration" (LAUDA and LUGER).

(1) ARAGÃO, H. B.—Brasil Medico, 1928, Anno XLII n. 27.
ARAGÃO, H. B.—Communicação á "Societé Brésilienne de Biologie" em 24 de Junho de 1928.

(2) TORRES, C. M.—Communicações á "Societé Brésilienne de Biologie" em 24 de Junho e 29 de Julho de 1928.

Similar changes in the nuclei of liver cells were afterwards found by me in 13 *M. rhesus* and 2 *M. cynomolgus* injected with the Brazilian virus of yellow fever recovered independently by BEAUREPAIRE ARAGÃO (3) and A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ (4) from two benign cases of yellow fever; one of these monkeys was directly injected with the blood from the patient; two were injected with *Aedes ægypti* after having fed upon the blood of yellow fever patients or experimentally infected *M. rhesus*; the others were monkeys used in an unbroken series of passages of the virus through *M. rhesus*, and perhaps this accounts for notable differences found in the histopathology of the liver from case to case, as under natural conditions the virus never passes directly from man to man.

The degree in which the oxychromatic degeneration occurs is in no way dependent upon the degree in which fatty and necrobiotic changes are found; in one instance it was the only change present in the liver, being there particularly intense.

The acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration) were not present in several *M. rhesus* not inoculated and dying of tuberculosis or obscure causes; notwithstanding in these livers, fatty infiltration and degeneration associated to necrobiotic changes were found.

Some stages ("butterfly" and "entamoeba-like" intranuclear figures, s. coloured Plate figs. *g*, and *h*) are rather frequent and by its characteristic shape facilitate the recognition of oxychromatic degeneration in sections made by a rapid technique (small pieces of liver fixed in folmaldehyde heated to 60°C—thirty minutes, frozen sections, hematoxylin, eosin, absolute alcohol, phenol-xylol-creosote, xylol, balsam) having no peculiar importance besides this.

Since the fatty degeneration and infiltration, necrosis and necrobiosis of the cells present considerable variations in degree from case to case in an unbroken series of passages of the virus through *M. rhesus*, lacking in two animals the liver of which was able to reproduce typical symptoms and lesions in the following passage, the acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration), as a rule, were found with much more regularity. In two *M. rhesus* killed on the 6th day, in one on the 8th, and in two on the 10th day, oxychromatic degeneration was so abundant as to occurs in almost every liver cell (s. fig. 2); in one instance, as previously reported, being rather intense, it was the only change found in the liver.

In two *M. rhesus* killed on the 14 and 15th days of inoculation, the oxychromatic degeneration was scarce and it was entirely absent in another killed on the 19th day.

Apparently it occurs, therefore, a gradual disappearance of the acidophilic intranuclear inclusions from the liver cells after having been in some cases very pronounced on the 10th day (s. fig. 2). Notwithstanding the fatty and necrobiotic changes can persist and were, in fact, rather in-

---

TORRES, C. M.—Brasil-Medico, 1928, Anno XLII, n. 36.
TORRES, C. M.—Sciencia Medica, Anno VI, n. 9, 1928.
(3) ARARÃO, H. B.—loc. cit.
(4) CUNHA, A. M. e MUNIZ, J.—Communicação á "Societé Brésilienne de Biologie", em 29 de Julho de 1928.

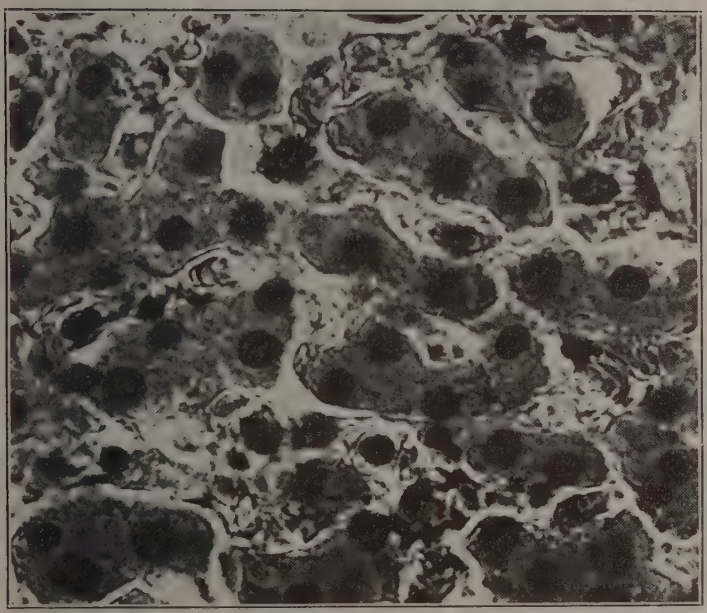


Fig. 1—Corte de figado de *M. rhesus* não inoculado. As cellulas hepaticas mostram nucleos normaes. Phot. J. Pinto

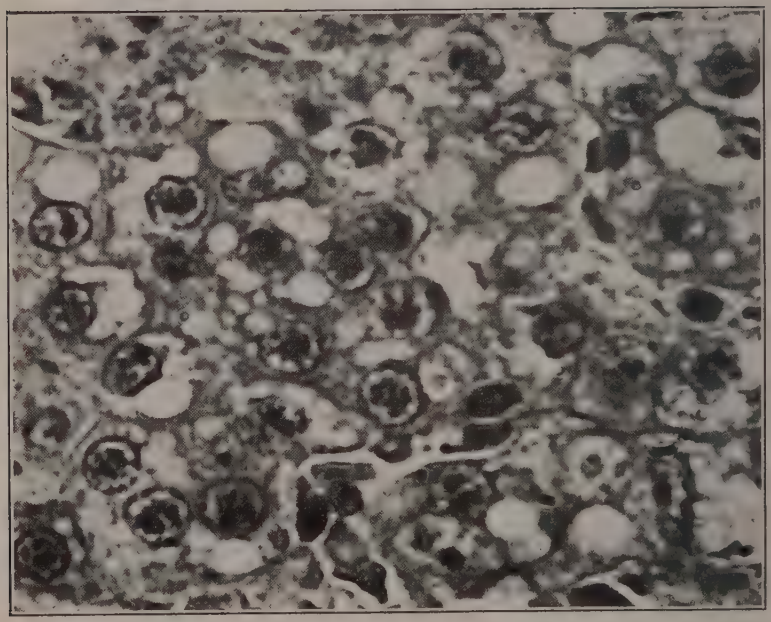


Fig. 2—Corte de figado de *M. rhesus* inoculado com *Aedes ægypti* infectados em doente de febre amarella e morto no decimo dia de inoculação. Quasi todas as cellulas apresentam inclusões acidophilas intranucleares. Phot . J. Pinto

C. MAGARINOS TORRES: Inclusões acidophilas intranucleares (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental.

Cellulas hepaticas *Macacus rhesus* em córtes fixados no HELLY e corados pela hematoxylina-eosina.

Em *a* e *b*, cellulas normaes. Em *c*, *d* e *e*, phases precoces da degeneração oxychromatica. Em *f*, *g*, *h* e *i*, phases adiantadas do mesmo processo. Em *g*, figura intranuclear em "ameba". Em *h*, figura intranuclear em "borboleta".

tense in a monkey killed after 15 days, in which the oxychromatic degeneration was however very scarce.

In one monkey killed after 5 days and which carried the virus to another animal, no oxychromatic degeneration was found, slight fatty periportal infiltration being the only change observed in the liver; the oxychromatic degeneration reappeared however in the next passage.

If one takes into account that sometimes in an unbroken series of passages of the virus of yellow fever through *M. rhesus* the liver shows a normal picture, that the histopathologic changes are very variable in intensity from case to case and that the degree in which the oxychromatic degeneration is found changes according to the day of inoculation the animal is killed, the acidophilic intranuclear inclusions, in my opinion, are more liable to assure the histopathologic diagnosis of the disease induced in *M. rhesus* than any other pathological findings previously mentioned there.

The facts brought to light do not contradict the presumption that the acidophilic intranuclear inclusions are associated to the presence of the virus inside the affected cells, as stated by many writers in respect to other filterable virus diseases in which similar changes occur in the nuclei (herpes zoster, symptomatic herpes, varicella, virus III infection of rabbits).

Assuming this it is explained at once the apparent independence between oxychromatic degeneration and fatty and necrobiotic changes in the liver, the former being related to the presence and possibly, multiplication of the virus itself inside the cells, the late being in the dependence of an associated toxemia.

To Drs. BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ I am indebted for their courtesy in lending me tissues for histopathologic study from the monkeys used in the course of their experiments.

Fig. 1—Magnification × 1,150. Section of the liver from a *M. rhesus* non-inoculated. The liver cells are seen to have a normal nucleus.

Fig. 2—Magnification × 1,150. Section of the liver of a *M. rhesus* injected with *Aedes ægypti* after having fed upon the blood of yellow fever patient and killed on the 10th day of inoculation. Almost every liver cell is seen to present acidophilic intranuclear inclusions.

PLATE

Liver cells from several *M. rhesus* inoculated with the Brazilian virus of yellow fever. Many stages of the oxychromatic degeneration are represented. In *h* and *g*, "butterfly" and "entamoeba-like" intranuclear figures. Figure *e* is similar to fig. 14 of RIVER's, article on filterable viruses. Amer. Jour. Path., 1928, Vol. IX, n. 2, pg. 91.

O liquido cephalo-racheano na febre amarella

Pelos Drs JOSÉ GUILHERME LACORTE e GILBERTO GUIMARÃES VILLELA.

Tivemos occasião de examinar uma dezena de liquidos cephalo-racheanos de doentes de febre amarella. A escassez dos casos foi devida á difficuldade existente na retirada de material de doentes que estão na maioria em estado grave e em outros nos quaes o clinico julga inopportuna a punccção lombar. Além disso, o material retirado em alguns casos não foi sufficiente para todas as reacções. Sahem estas notas rapidas como inicio de estudo mais apurado para outra occasião, se houvér.

Abaixo seguem os dados referentes aos exames praticados.

Tensão: Em todos os casos o "liquor" sahiu com forte tensão, chegando mesmo, em uma vez, a escoar com forte jacto.

Aspecto: A' excepção de um caso em que houve hemorrhagia leve das meninges, e em outro em que se apresentou amarellado (xanthochromia) o aspecto foi sempre limpido e crystallino.

Cytologia: O exame cytologico nada accusou de anormal. No liquido hemorrhagico as hematias ficaram bem coradas, assim como os globulos brancos. Nos demais, os lymphocytos tiveram sempre aspecto e porcentagem normaes, o mesmo se dando com a quantidade por millimetro cubico (de 0,26 a 0,55).

Reacções de globulinas: Das reacções commummente exigidas pelos clinicos em exames de "liquor" praticámos as de PANDY e NONNE-APPELT. A de PANDY foi sempre negativa, ao contrario da de NONNE-APPELT que foi positiva em todos os casos, ora forte ora fracamente. Não sabemos como explicar esta discordancia dado o rigôr com que praticámos as reacções, sempre empregando testemunhos.

Reacção de WASSERMANN: Negativa em todos os casos mesmo num liquido de doente com WASSERMAMN positivo no sôro.

Indice de refracção: Manifestou-se um pouco elevado em todos os liquidos (de 1,3356 e 1,3360) (apparelho de ZEISS ABBE, temperatura fixa de 17,5°).

Exame chimico:

Pigmentos biliares: Resultado negativo em todos os casos, mesmo no unico liquido amarello que examinámos (xanthochromia).

Urobilina: Resultado negativo em todos os casos.

Glycose: Apresentou-se com taxa elevada sómente num caso grave da doença (0,80 °/oo).

Albumina: Elevada em todos os casos (de 0,25°/oo a 0,55°/oo methodo de RAVAUT).

Chloretos: Normaes num dos casos (0,72°/o), elevados nos restantes (de 0,77°/o a 0,85°/o).

Calcio: Normal (de 4,2 a 5,2 milligrammas por °/o).

Inoculação experimental em animaes: Um ponto ainda não decidido é a infectuosidade do liquido cephalo-racheano. Resolvemos verifical-o e

para esta prova trabalhamos junctamente com o Dr. HENRIQUE ARAGÃO. Foram inoculados tres *Macacus rhesus* com 10 cc. cada um de liquido retirado de dois doentes com menos de 72 horas de doença e outro com mais tempo. Estes animaes não apresentaram os signaes classicos da molestia experimental. Inoculamos igualmente coelhos e cobayas que permaneceram sem alteração.

Infelizmente o numero restricto dos casos não permitte conclusão definitiva a respeito.

Le liquide cephalo-rachidien dans la fièvre jaune

Par les Drs. JOSÉ GUILHERME LACORTE et GILBERTO GUIMARÃES VILLELA.

Nous avons pu examiner une dizaine d'échantillons de liquide céphalo-rachidiens provenant de malades de fièvre jaune. La rareté des cas mis à notre disposition est due à la difficulté qui se présente pour prélever de ce matériel à des malades qui, pour la majeure partie, sont gravement atteints, ou à d'autres, chez lesquels le praticien juge inopportune la ponction lombaire. De plus, le matériel prélevé dans quelques cas, n'a pas été suffisant pour toutes les réactions.

Nous donnons ci-dessous les détaits relatifs aux examens pratiqués.

Tension : Dans tous les cas, le liquide est sortie avec forte tension, arrivant même, une fois, à former un jet.

Aspect: A l'exception d'un cas où il y eut hémorrhagie légère des méninges, et d'un autre où il se présenta jauni, (xanthochromie) l'aspect fut toujours limpide et cristallin.

Cytologie: L'examen cytologique ne montra rien d'anormal. Dans le liquide hémorrhagique, les hématies restèrent bien colorées, de même que les globules blancs. Dans les autres, les lymphocytes ont toujours gardé leur aspect normal et pourcentages normaux, la même chose se produisant pour la quantité par millimètre cube (de 0.26 à 0.55).

Réaction de globulines: Parmi les réactions communément exigées par les praticiens dans les examens de liquide nous avons pratiqué celles de PANDY et de NONNE-APPELT. Celle de PANDY a toujours été négative, au contraire de la deuxième qui fut positive dans tous les cas, tantôt fortement, tantôt faiblement. Nous ne savons comment expliquer cette discordance étant donnée la rigueur avec laquelle nous avons effectué ces réactions, en employant toujours des témoins.

Réaction de WASSERMANN: Négative dans tous les cas, même avec un liquide de malade où le WASSERMANN était positif avec le sérum. Indice de réfraction: Un peu élevé dans tous les liquides (de 1,3356 à 1,3360, appareil de ZEISS-ABBE, temperature fixe de 17,5o).

Pigments biliaires: Résultat négatif dans tous les cas, même dans l'unique liquide jaune que nous avons examiné (xanthochromie).

Urobiline: Résultat négatif dans tous les cas.

Glucose: Ne s'est présentée avec un taux élevé que dans un cas grave de la maladie (0,80 o/oo).

Albumine: Elevée dans tous les cas (de 0,25 à 0,55‰, méthode de RAVAUT). Chlorures: Normaux dans l'un des cas (0,72‰); élevés dans les autres (de 0,77‰ à 0,85‰).

Calcium: Normal (de 4,3 à 5,2 milligrammes pour ‰).

Inoculations expérimentales chez des animaux: un point pas encore élucidé, c'est l'infectiosité du liquide céphalo-rachidien. Nous avons résolu de le vérifier et pour cette épreuve, nous avons travaillé avec le Dr. HENRIQUE ARAGÃO. Nous avons inoculé trois *Macacus rhesus* avec 10 cc. chacun, de liquide prélevé sur deux malades atteints depuis moins de 72 heures, et sur un malade plus ancien. Ces animaux n'ont pas présenté les signes classiques de la maladie expérimentale. Nous avons inoculé également des lapins et des cobayes qui sont demeurés indemnes.

Malheureusement, le nombre restreint des cas ne permet pas de tirer de conclusion définitive à ce sujet.

Observações sobre alguns elementos da urina na febre amarella.

Pelo Dr. J. C. N. PENIDO.

Na actual epidemia da Febre Amarella, tivemos opportunidade de fazer exames em serie, nas urinas dos doentes internados no Hospital Oswaldo Cruz. Desejavamos vêr quaes as modificações de alguns elementos no decorrer da doença e se pelos elementos da urina poderiamos chegar a qualquer indicação quanto ao diagnostico ou prognostico.

Examinámos urinas de mais de 20 doentes, em condições excellentes, a maioria das vezes. As technicas seguidas foram as indicadas pelo Dr. J. CARNEIRO FELIPPE e todas ellas rigorosamente applicadas.

Posteriormente, lançando mão de outros processos, em material do Hospital S. Sebastião, pudémos verificar a exactidão dos nossos resultados, comparando-os com os obtidos pelo Dr. FELIPPE.

Os caracteres geraes são modificados do modo seguinte:

Volume – Diminuido no principio da doença e augmentado na convalescença. Por outras razões, não nos foi possivel estudar este ponto, para verificar a eliminação de liquidos. No emtanto, embora não tenhamos dados muito completos e perfeitos, temos a impressão que o volume fica reduzido em todos os casos nos primeiros dias da doença. Esta reducção de volume é mais ou menos proporcional á gravidade do caso. Nos casos benignos ha uma reducção de 20 a 30%, reducção esta que se accentua nos de extrema gravidade, nos quaes o volume é praticamente nullo. A reducção do volume total por 24 horas é phenomeno commum a todas as doenças febris e a Febre Amarella não faz excepção.

Côr – É de amarello topazio durante o periodo febril, igual á dos febricitantes; na convalescença a côr póde chegar ao verde garrafa, pela presença de pigmentos biliares, em quantidade formidavel. Em certos casos depois do periodo febril, a côr é amarello-palha.

Cheiro – E o proprio das urinas normaes.

Reacção – É acida ao papel de tournesol.

Densidade—E em geral mais elevada que a normal, não seguindo a sua variação qualquer modificação systematica. Explica-se perfeitamente esta ausencia de variação systematica, pelas concentrações variaves e oppostas de alguns elementos que se acham dissolvidos no liquido.

Dos constituintes normaes, dosámos systematicamente a uréa, os chloretos em Na Cl, e o acido urico e bases puricas reductoras do iodo (reactivo de RUHEMANN).

A concentração da uréa varia conforme a gravidade do caso. Nos casos benignos e nos primeiros dias da doença, a sua concentração é cerca de 2 1/2 vezes o valor normal (Graphicos n. 1 e 2).

Nos casos de gravidade média, e tambem nos primeiros dias da doença, a concentração é cerca de 1 1/2 vez maior que o normal (Graphico

n. 3). Nos casos mortaes, no decurso da doença, a concentração não attinge os valores normaes (Graphicos n. 4 e 5).

Em uma urina de cadaver, verificámos a concentração de 4gr,02 em 1000. Não se tratava de um caso da forma anurica, pois havia 80 c.c. de urina na bexiga, ao passo que nessas formas se encontram apenas algumas gottas de urina ou no maximo alguns centimetros cubicos.

Excluidas as formas muito graves, encontra-se tambem augmentada a eliminação diaria da uréa, pois a reducção de volume é menor que o augmento da concentração. Infelizmente não tivemos um só caso em que pudessemos verificar estes elementos desde as primeiras horas da doença.

A convalescença se dá bruscamente e nessa occasião a concentração e a eliminação total da uréa diminuem tambem bruscamente, ficando ás vezes abaixo do normal, para attingil-o quando se acha curado o doente.

Vê-se pois que se póde chegar a algumas conclusões prognosticas pela apreciação dos valores da eliminação uréica. Naturalmente nos casos em que os numeros que exprimem essas concentrações estão nas zonas intermediarias, a conclusão é mais difficil.

Os chloretos, expressos em Na Cl, seguem uma marcha inversa á da uréa. Sua concentração é a quinta parte ou mais que o valor normal no inicio da doença. Este é um phenomeno geral observado em qualquer caso da doença, quer os benignos, quer os mortaes. Sómente uma vez, num doente cuja agonia foi particularmente longa, observámos uma concentração elevada de chloretos, na urina excretada nesse periodo (Graphico n. 4). Em outro, o caso mais benigno dos examinados, houve diminuição da concentração dos chloretos, em cerca de metade, no 3º e 4º dias. Foram as excepções que encontrámos. A regra porem é a concentração oscillar entre 0,5 e 2,5 p. 1000 nos primeiros dias da doença e augmentar bruscamente no momento da crise da convalescença.

Na vespera dessa crise de chloruria a concentração baixa, ás vezes, mais que nos primeiros dias (Graphico n. 1). Não se póde allegar que seja a pequena eliminação de chloretos condicionada pela falta de absorpção de Cl. Desde que o estado do doente o permittia, era-lhe fornecido alimento salgado que levava ao organismo uma quantidade de Na Cl muito superior á eliminada nas 24 horas immediatas.

O Dr. J. TEIXEIRA teve occasião de, num caso benigno, no 6º dia de molestia, fazer a prova de eliminação de chloretos (technica LIPCHWITZ) e verificou que o rim era perfeitamente permeavel nesse caso. Tratava-se de um caso particularmente benigno, no fim do periodo febril, que provavelmente entrára em convalescença.

Crêmos que no decurso da doença ha uma notavel diminuição na eliminação de chloretos, mais accentuada do que informam os auctores, e portanto retenção desses elementos no organismo. Confirmam o nosso ponto de vista as dosagens feitas no sangue e no liquor, nos quaes, na maioria dos casos, os chloretos estão augmentados (Drs. J. CARNEIRO FELIPPE, J. G. LACORTE e G. G. VILLELA).

O acido urico e bases puricas, reductoras do iodo, são, em regra, augmentados nos primeiros dias, nos casos benignos. Nos demais casos este augmento é pequeno e suas variações se dão na proximidade de 0,8 p. 1000. Raramente encontramos taxas abaixo da normal no decurso da do-

ença. Na convalescença no emtanto ha uma sensivel baixa dessas bases. A concentração desses elementos é mais ou menos parallela á concentração da urêa.

Dos elementos anormaes, pesquizámos a albumina verdadeira, a pseudoalbumina e a glycose. As duas primeiras foram encontradas em todos os casos.

A albumina verdadeira, sempre presente, tem uma concentração muito variavel. Nos casos benignos a quantidade é relativamente pequena (cerca de 0,50 p. 1000) e rapidamente desapparece. Nos casos mortaes e graves esta quantidade é muito grande (2 a 12 grammas) e persiste durante mais tempo.

A pseudo-albumina tambem foi encontrada em quantidade menor que a albumina, desapparecendo mais precocemente.

A glycose nunca foi encontrada no primeiro periodo. Sómente uma vez na convalescença de uma forma grave encontrámos glycose, em pequena quantidade, durante um curto periodo. É interessante assignalar este facto porque os doentes, além dos alimentos, recebiam systematicamente injecções de sôro glycosado, por via rectal ou subcutanea. Vê-se que o organismo, no correr da molestia, retem normalmente o assucar.

Os pigmentos biliares só foram encontrados no periodo de convalescença. Por vezes a quantidade era tão accentuada que a urina se tornava de côr verde-garrafa. Nos primeiros dias, porém, a sua ausencia na urina foi a regra, sem excepções.

Os saes biliares, no emtanto, apparecem mais precocemente que os pigmentos, porém nunca no periodo primario da doença.

A urobilina foi encontrada em todos os casos e em quantidades muito variaveis. Não a dosámos por processo chimico, limitando-nos a apreciar a quantidade pelo grão de fluorescencia. Nada podemos concluir quanto á urobilinuria quer para o diagnostico ou prognostico. Como este chromogenio se encontra em numerosas doenças, crêmos que o seu valor é muito pequeno para o diagnostico da infecção.

A indoxila foi encontrada em grandes quantidades nas formas graves e principalmente naquellas em que havia abundantes hemorrhagias intestinaes. Nas formas benignas e nas graves, não hemorrhagicas, a ausencia desse chromogenio é a regra. O seu apparecimento na quantidade normal dá-se na convalescença.

O sedimento da urina dos amarellentos é muito interessante. Na phase de invasão observa-se uma descamação epithelial muito forte de todo o apparelho urinario. Vê-se um numero excessivo de cellulas epitheliaes, chatas, em raqueta, fusiformes, cylindricas pequenas e cylindricas grandes, e sempre numerosos leucocytos. A' medida que a infecção evolue, começam a desapparecer as cellulas epitheliaes chatas e em raqueta, persistindo e dominando em numero as epitheliaes cylindricas, ao lado de leucocytos. Na convalescença desapparecem essas cellulas cylindricas grandes e reapparecem as epitheliaes chatas normaes da urina. A cylindruria é muito frequente e encontrámos como moda cylindruria granulosa no periodo febril, a granulosa e hyalina no periodo de convalescença e finalmente a hyalina e cerea nas proximidades da cura. Tambem notámos nos casos benignos uma cylindruria epithelial, de mixtura com cylindros de outros typos. Essa cylin-

druria mixta é nas formas graves excessivamente intensa. Cónvem notar que esses cylindros desapparecem com facilidade nas urinas fermentadas. Ao lado desses elementos cellulares, notámos crystaes de uratos e abundante substancia amorpha, principalmente nas urinas conservadas em baixa temperatura. Tambem devemos assignalar uma crise de oxalaturia que observámos nos casos benignos no fim da convalescença. Talvez haja alguma relação entre essa oxalaturia e os cylindros de calcio observados em córtes de rim de amarellentos.

CONCLUSÕES.

I. Pode-se avaliar a gravidade dos casos de febre amarella pelo exame em serie da urina.

II. Nos casos benignos, a uréa existe em grande concentração na urina e a sua eliminação diaria é elevada.

III. Nos casos mortaes, a eliminação da uréa é muito reduzida e sua concentração muito abaixo da normal.

IV. A eliminação de chloretos é muito diminuida quer nos casos graves quer nos benignos.

V. O acido urico e bases puricas eliminam-se de modo semelhante á uréa.

VI. A eliminação dos chloretos e da uréa seguem uma marcha inversa um ao outro. Ha augmento da eliminação dos chloretos e diminuição da eliminação da uréa no momento da convalescença.

VII. A albuminuria e a cylindruria são a regra desde o 3º dia.

VIII. Não ha glycosuria durante o decurso da doença.

IX. No sedimento urinario encontram-se cellulas cylindricas grandes, provavelmente provenientes dos tubos rectos do rim.

X. Na febre amarella a eliminação de urina se dá como nas nephroses.

Observations on a few elements of urine in yellow fever.

By Dr. J. C. N. PENIDO.

During the actual epidemic of yellow fever, we had an opportunity to make serial examinations, of the urines of patients under treatment at the Oswaldo Cruz Hospital. We were anxious to see what modifications of the elements of the urine occurred during the course of the illness, and also whether by examination of the elements of urine, a diagnosis or prognosis of the disease could be arrived at.

We examined urines of more than 20 patients, in most cases under excellent conditions. The technical methods followed were those indicated by Dr. J. CARNEIRO FELIPPE, all of which were rigourously performed.

Later on, applying other processes, using material obtained from S. Sebastian Hospital, we checked the accuracy of our results, by comparing them with those obtained by Dr. FELIPPE.

The general characteristics of urines were found modified in the following way:

Volume—Reduced at the beginning of the illness and increased during convalescence. For different reasons, it was not possible to study this point, in order to control the elimination of liquids. Although we missed complete and thorough data, we have a feeling that the volume is reduced in every case during the first days of the illness. This reduction of the volume is more or less proportional to the severeness of the case.

In mild cases, there is a reduction of from 20 to 30 o/o, which reduction is more accentuated in extremely severe cases, being practically nil in the latter. The reduction of the total volume per 24 hours is a phenomenon common to all febrile diseases there being no exception in the case of yellow fever.

Color—Topaz yellow during the febrile stage, as in other type of fever; during convalescence the color may acquire a bottle-green shade, owing to the presence of biliar pigments, in large quantity. In certain cases, after the febrile stage, the tint is straw-yellow.

Odor—The odor is the same as in normal urines.

Reaction—Acid to litmus paper.

Specific gravity—Generally higher than normal, however not following in its variation, any systematical alteration. This absence of a systematical variation finds a perfect explanation in the varying and opposed concentrations of some elements existing as solutes in the liquid.

Of normal components, we systematically measured the urea, the chlorides in Na Cl and the uric acid and puric bases which reduce the iodine (RUHEMANN's reagent).

The concentration of urea varies according to the severeness of the

case. In mild cases, as also in the first days of the illness, its concentration is about 2 1/2 times the normal value (Graphics 1 and 2).

In cases of medium seriousness, and also during the first days of the illness, the concentration is about 1 1/2 times higher than the normal (Graphic 3). In mortal cases during the course of the illness the concentration never reaches the normal values. (Graphics 4 and 5).

In a urine from a corpse, we verified a concentration of 4gr,02 per 1000. It was not a case of the anuric form, for there were 80 c.c. of urine in the bladder, whereas in the anuric form only a few drops, or hardly a few cubic centimeters should be found.

Excepting in very severe forms, the daily elimination of urea is also increasing, while fhe reduction of volume of the urine is less than the increase of urea concentration. Unluckily, we did not have a single case at hand in which we were able to control these elements from the first hours of the Illness.

The convalescence appears suddenly, and at this time the concentration and the total amount of eliminated urea decreases equally in a very sudden manner, remaining sometimes under the normal amount untill the patient is cured.

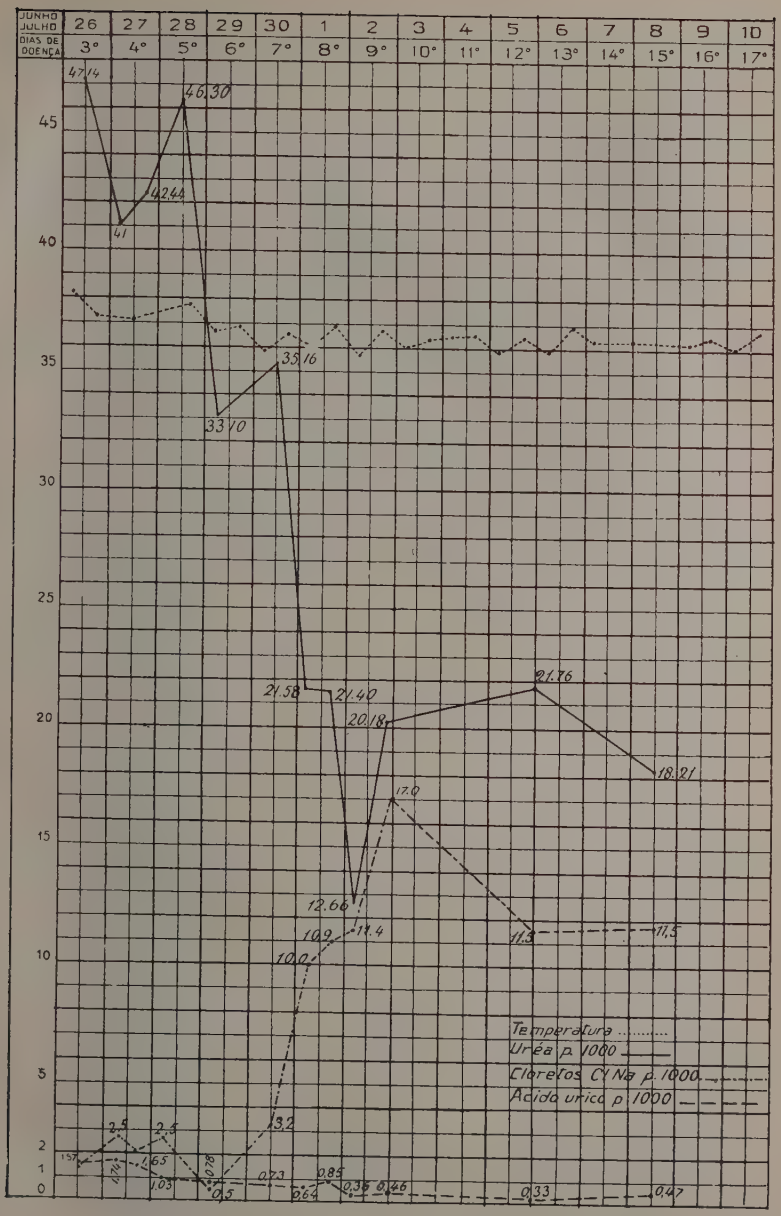
We realize then that some prognostical conclusions can be arrived at, through an appreciation of the values of ureics elimination. Of course, in cases in which the numbers stating those concentrations remain in the intermediary zones, the conclusion is a more difficult one.

The chlorides specified in Na Cl follow a process inverse of the urea diagram. Their concentration is the fifth part, or more, of the normal value at the beginning of the illness. This is a general phenomenon observed in whatever case of the disease, either mild or mortal. Only once, in a patient whose agony lasted a particularly long time, we observed a very high concentration of chlorides in the urine, excreted during this period. (Graphic 4) An another occasion, in the mildest of the examined cases, there was a decrease of the chloride concentration, about one half on the 3rd and 4th day. These were the exceptions we met with. As a rule, however, the concentration oscillates between 0.5 and 2.5 per 1000 in the first days of illness, and increases suddenly at the moment of the convalescence crisis.

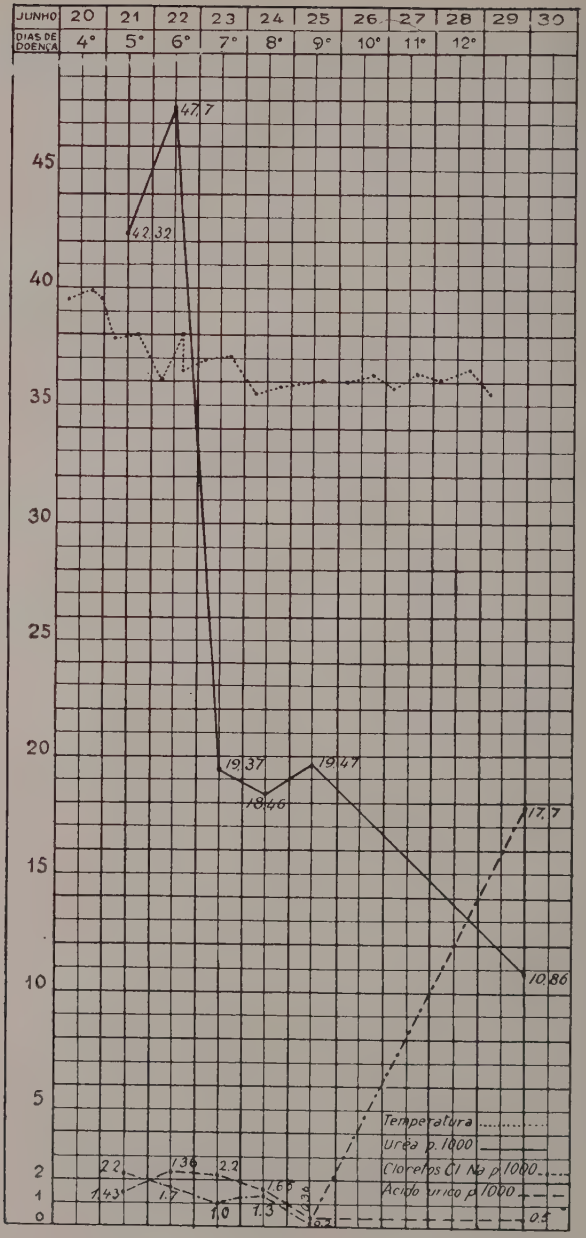
On the day before this crisis of chloruria the concentration, sometimes falls lower than in the first days (Graphics 1 and 2). One can not say the small chlorid elimination should be determined by the lack of chlorine absorption. When condition permitted the patient was provided with salted food which brought to the system a quantity of Cl Na higher than the amount eliminated during the next 24 hours.

Dr. J. TEIXEIRA had an opportunity, in a mild case, on the 6th day of the illness, to make a proof of the chloride elimination (LIPCHWITZ technics) and ascertained that the kidney was perfectly permeable in this case. The case was a particularly mild one at the end of the febrile stage probably already entering into the convalescence stage.

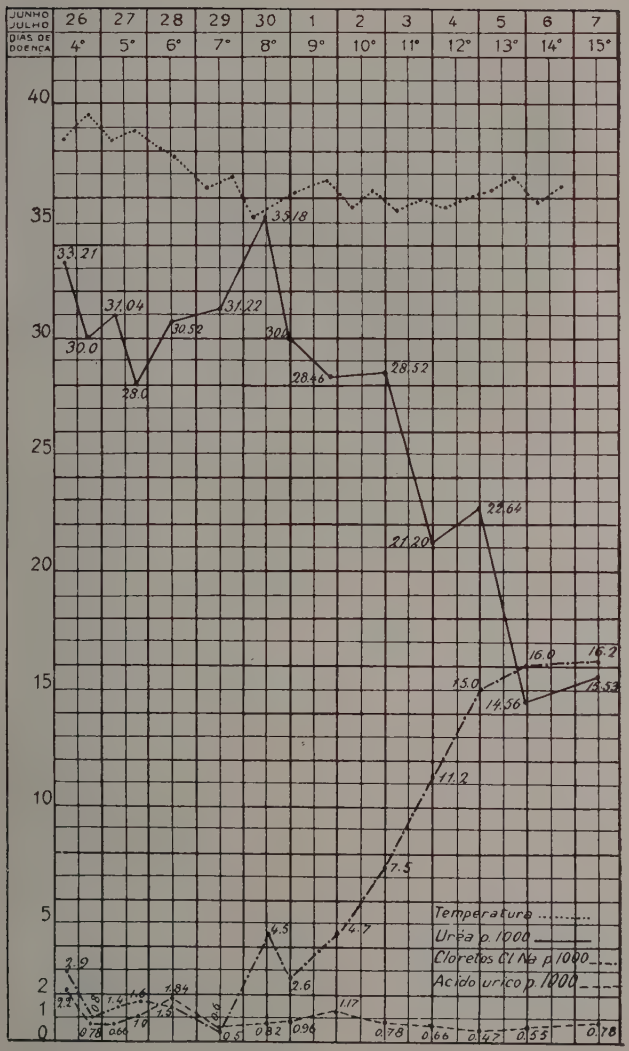
We believe that, in the course of the illness, there is a noteworthy decrease in the chlorides eliminated, more accentuated than stated by reference books, and consequently a retention of those elements within the system. This is confirmed by the measurements effected in the blood and


JUNHO JULHO
DIAS DE DOENÇA
26 27 28 29 30 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
3° 4° 5° 6° 7° 8° 9° 10° 11° 12° 13° 14° 15° 16° 17°
47.14
41
42.44
46.30
33.10
35.16
21.58
21.40
20.18
21.76
18.21
17.0
12.66
11.4
10.9
10.0
11.3
11.5
3.2
2.5
2.4
1.57
1.25
1.65
1.03
0.78
0.5
0.73
0.64
0.85
0.35
0.46
0.33
0.47
45
40
35
30
25
20
15
10
5
2
1
0
Temperatura .....
Urêa p. 1000 ——
Cloretos Cl Na p. 1000 - - - -
Acido urico p. 1000 — — —

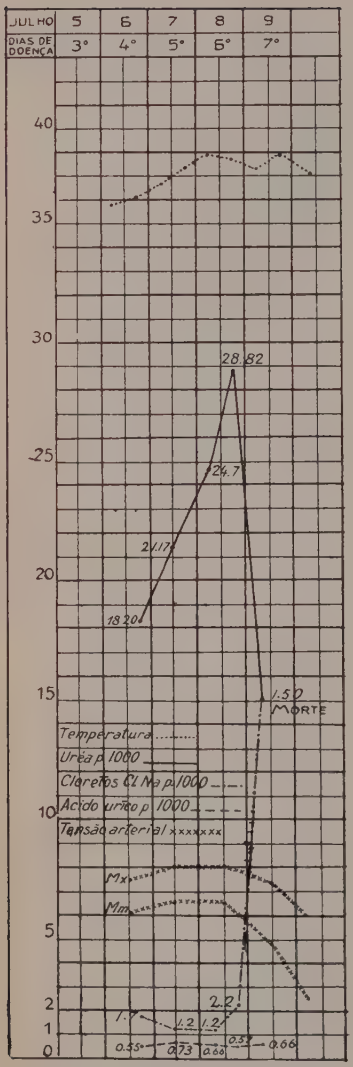
Graphico n. 1


JUNHO 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
DIAS DE DOENÇA 4° 5° 6° 7° 8° 9° 10° 11° 12°
45
40
35
30
25
20
15
10
5
2
1
0
47.7
42.32
19.37
18.46
19.47
17.7
10.86
Temperatura
Urea p. 1000
Cloretos Cl Na p/1000
Acido urico p/1000
2.2
1.43
1.7
1.36
2.2
1.0
1.65
1.3
0.8
0.2
0.5

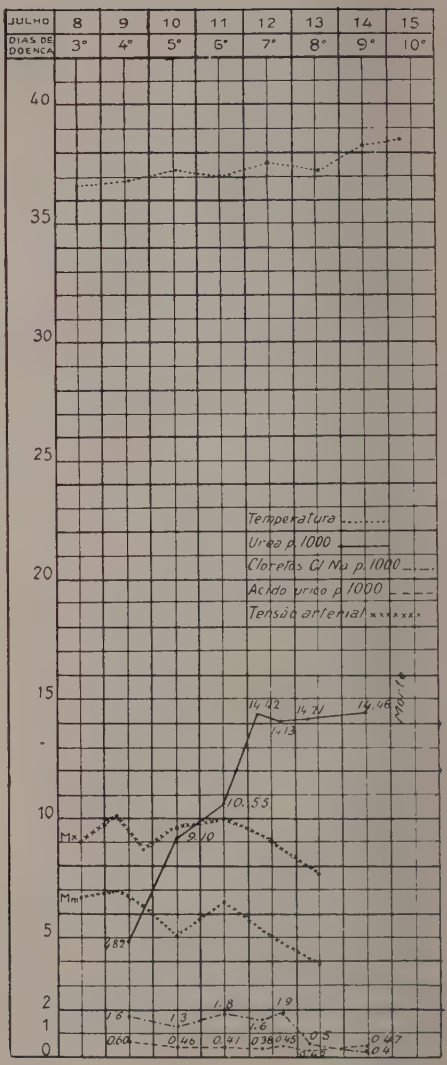
Graphico n. 2


JUNHO JULHO
26 27 28 29 30 1 2 3 4 5 6 7
DIAS DE DOENÇA
4° 5° 6° 7° 8° 9° 10° 11° 12° 13° 14° 15°
40
35
30
25
20
15
10
5
2
1
0
33.21
30.0
31.04
28.0
30.52
31.22
35.18
30.0
28.46
28.52
21.20
22.64
16.0
16.2
15.0
14.56
15.53
11.2
7.5
4.5
2.6
14.7
2.9
2.2
1.8
1.4
1.6
1.0
7.84
7.9
2.9
0.5
0.82
0.96
1.17
0.78
0.66
0.78
0.66
0.47
0.55
0.78
Temperatura .....
Urêa p 1000 _____
Cloretos Cl Na p 1000 _ _ _
Acido urico p 1000 _ _ _

Graphico n 3



Graphico n. 4



Graphico n. 5

liquor in which, in most cases, chlorides are increased (Drs. J. CARNEIRO FELIPPE, J. G. LACORTE and G. G. VILLELA).

The uric acid and the puric bases, reducing agents of iodine are, as a rule, increased in the first days in mild cases. In other cases, this increase is of small extent and its variations are given in the vicinity of 0.8 per 1000. We seldom found the quantities of the above to be less than normal during the course of the illness. However during convalescence, there is a sensible fall of these rates. The concentration of these elements is more or less parallel to the urea concentration.

Of the abnormal elements, we searched for the real albumin, the pseudo-albumin and glucose, the two first were found in all cases.

The real albumin, always present, has a highly varying concentration. In mild cases, the quantity is rather small (about 0.50 per 1000) and disappears quickly. In fatal and severe cases, this quantity is very high (2 to 12 grams) and persists for a longer time.

The pseudo-albumin was also found in less quantity than albumin disappearing still earlier.

Glucose was never found in the first period. Only once, in the convalescence of a severe form we found glucose, to a small extent during a short period.

It is interesting to report this fact, because the patients, besides being fed, systematically received injections of glucosed serum, either via rectal or subcutaneous. One sees that the system, in the course of the illness, normally retains sugar.

The biliar pigments were only observed in the period of convalescence. At times the quantity was so high that the urine would turn to a bottle-green shade. In the first days however, its absence from the urine was complete, without any exception.

The biliar salts, however, appear earlier than the pigments, but however never during the primary period of the illness.

The urobilin was found in every case and in most variable quantities. We did not measure this by a chemical process. We confined ourselves to estimating the quantity by the degree of fluorescence. We were unable to conclude that urobilin neither could be used either for diagnosis or for prognosis purposes. As this chromogen is to be found in numerous diseases, we believe its value is of very small value for the diagnosis of the illness.

The indoxyl was found in big quantities in the severe forms, principally those in which there were abundant intestinal hemorrhages. In mild or in severe which were not hemorrhagic the absence of this chromogen is a general rule. Its reappearance in normal quantity occurs during the convalescence.

The sediment in the urine of yellow fever patients is very interesting in the invading stage, a very strong epithelial desquamation of the whole urinary apparatus is to be observed. One sees an excessive number of epithelial cells, flat, racket shaped, fusiform, cylindrical small and large and always numerous leucocytes. As the disease progresses the flat and racket-shaped epithelial cells begin to disappear. The cylindrical epithelials and the leucocytes remain and dominate in number the flat and racket

shaped epithelial cells. In the convalescence stage the large cylindrical epithelial cells disappear and then the normal flat ones of the urine appear again. Cylindruria is most frequent, and we find as a rule the granulous cylindruria during the febrile stage, the granulous and hyaline in the period of convalescence and finally the hyaline and waxy about the time of the cure of the illness. We also noted in mild cases an epithelial cylindruria in combination with cylinders of other kinds. This combined cylindruria is in severe forms exceedingly intense. It is to be noted that these casts easily disappear in fermented urines. Besides the cellular elements, we observed crystals of urates with an abundant amorphous substance especially in urines kept in low temperatures. We must also point out a crisis of oxalaturia which we observed in the mild cases at the end of the convalescence. There might be perhaps some relation between this oxalaturia and the lime casts observed in cuts of kidney of yellow fever patients.

CONCLUSIONS.

I. We may determine the severeness of yellow fever cases by serial examination of urines.

II. In mild cases, urea exists in high concentration in the urine and its daily elimination is high.

III. In fatal cases, the elimination of urea is much reduced and its concentration much below the normal.

IV. The elimination of chlorides is very small, either in severe or in mild cases.

V. Uric acid and puric bases are eliminated in a similar way as urea.

VI. The elimination of chlorides and urea follow an inverse process in relation, one to the other. There is an increase of the elimination of chlorides and a decrease of the elimination of urea at the time of convalescence.

VII. Albuminuria and cylindruria appear as a rule at the 3rd day.

VIII. There is no glycosuria during the course of the illness.

IX. In the urinary sediment, large cylindrical cells are to be found, probably proceeding from the tubes of the kidney.

X. In yellow fever the elimination of urine effects itself as in nephrosis.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

Algumas observações sobre o bacillo da tuberculose collocado em condições experimentaes proximas ás condições saprophyticas

Pelos Drs. A. FONTES e J. BARBOSA DA CUNHA.

Desde 1923 que um de nós se vem occupando com o estudo do desenvolvimento do bacillo da tuberculose, adaptando-o a meios de cultura artificiaes, com o objectivo de obter a cultura do virus sob a forma granular, e ainda verificar a possibilidade da conservação do virus tuberculoso com suas propriedades morbigenas, mesmo quando collocado em condições proximas ás do saprophytismo.

I

Culturas de tuberculose aviaria, papagaio e bovina, antigas no laboratorio, com 5 mezes de desenvolvimento em gelose glycerinada a 5%, foram transplantadas em 5—VII—23, para meio de SABOURAUD maltosado e meio de SABOURAUD maltosado-glycerinado a 5%. As culturas se desenvolveram abundantemente nos tubos com o meio glycerinado e foram pouco abundantes nos tubos isemptos de glycerina. As amostras semeadas se comportaram igualmente, não sendo possivel estabelecer differença apreciavel no desenvolvimento das respectivas colonias, quando comparadas nos mesmos meios de cultura. (Observação feita em 11—XI—1923).

N'esta ultima data se procedeu a uma nova passagem nos mesmos meios, tendo sido observado um mez depois culturas mais abundantes que da primeira passagem. Estas culturas foram conservadas até Abril de 1924, quando iniciamos a verificação por novas series utilisando-nos das amostras mais antigas da collecção do Instituto. Dentre estas sobreleva notar a amostra T. M. 1. (Typo humano) que nessa occasião contava cerca de 25 annos de passagens successivas em meios artificiaes, *sem passagem em animal* e que conservava toda a sua virulencia e caracteres morphologicos e culturaes classicos.

Não só essa amostra como ainda outra do typo humano (T. M. 4), outras do typo bovino foram mantidas por passagens successivas em meios de SABOURAUD maltosado, glycerinado-maltosado-glycosado, glycerinado-glyçosado, conservação, conservação-glycerinado e gelose glycerinada, até Outubro de 1924, sem que fossem notadas differenças accentuadas no desenvolvimento das culturas nem na virulencia das amostras.

Pelos exames repetidos essas amostras conservaram sempre sua morphologia em bastonetes mais ou menos granulosos, sua acido-resistencia mais ou menos accentuada e sua virulencia sem modificação apreciavel. O mesmo succedeu em culturas mantidas por passagens repetidas em meios liquidos de composição identica ao SABOURAUD (com exclusão de gelose) e ao meio usado para o preparo da vaccina do carbunculo sympto-

matico, immensamente favoravel á attenuação desse germen, e que é constituido pelo caldo de carne, sôro de cavallo e glycose.

Ainda ahi as amostras de tuberculose semeiadas se desenvolveram sem attenuação apreciavel de sua virulencia e sem modificação sensivel na sua morphologia e caractéres culturaes. (Observações feitas em 8 de Setembro de 1924).

II

Alguns dos tubos de cultura em SABOURAUD maltosado, glycerinado-maltosado e glycosado-maltosado foram deixados fóra da estufa em exposição á luz diffusa, arrolhados com rolha de cortiça, sem nenhuma repicagem. Assim de Agosto de 1924 a Novembro de 1926 permaneceram essas culturas, quando foram então repicadas para novos tubos de SABOURAUD. *A semente não se desenvolveu nos tubos repicados,* que foram conservados na estufa durante 45 dias.

Addicionou-se então um pouco de caldo simples aos tubos originarios e foram elles mantidos em estufa até Fevereiro de 1927. Nessa data a amostra T. M. 1., semeada em SABOURAUD-glycosado em 29—VIII—24, repicada novamente deu desenvolvimento a culturas pujantes de bacillos de tuberculose alcool-acido-resistentes.

Em 6 de Janeiro de 1928, procedeu-se a uma nova transplantação da semente do tubo original T. M. 1., semeado em Agosto de 1924, tendo havido abundante desenvolvimento em todos os tubos semeados.

A vitalidade da semente no meio de SABOURAUD-glycosado se mantinha ainda, após 3 annos e 5 mezes. As outras amostras não mais se desenvolveram.

As experiencias acima referidas demonstram a *possibilidade do bacillo da tuberculose manter-se em estado de vida latente em culturas artificiaes durante o praso de 2 annos e 7 mezes recobrando a sua virulencia (na accepção da capacidade de reproducção) sem perder os seus caracteres morphologicos e culturaes,* bastando *para isso encontrar elementos favoraveis ao seu desenvolvimento: CALOR, ELEMENTO NUTRITIVO E HUMIDADE.*

III

Essas experiencias conduziram o nosso espirito á verificação da possibilidade de vida do bacillo da tuberculose em condições proximas ao saprophytismo natural. Para esse fim estabelecemos a seguinte serie experimental, cujo protocollo damos a seguir.

21 de Março de 1927—Foram semeados 2 balões de caldo glycerinado a 5 o/o em superficie com cultura em pelle de T. M. R. (amostra isolada de urina de homem, typo humano); 2 balões com cultura em pelle de T. H. A. (typo humano, proveniente da Argentina) e 2 balões de T. M. 1. (typo humano, isolado de escarro).

Os balões foram conservados á temperatura ambiente e expostos á acção da luz diffusa.

Na 1ª. semana todas as pelles semeadas foram ao fundo dos balões.

5—5—927—Em um dos balões semeados com T. M. R. (balão 1) a semente que fora ao fundo serviu de nucleo ao desenvolvimento de uma cultura de cogumelo (observação feita 45 dias depois da semeiadura).

22—6—927—Nessa data um fragmento da semente do balão 1 que accarretava comsigo uma particula de cultura do cogumelo emulsionada em um pouco dagua physiologica foi inoculado em 2 cobayas.

Estas cobayas apresentaram cancro e ganglios correspondentes infartados no prazo commum.

22—8—927—Nessa data foi extrahido um ganglio inguinal de uma das cobayas. Esfregaços do ganglio mostraram numerosos bacillos acido-alcool-resistentes, e mycelio. Com pús do ganglio foram semeados tubos de batata glycerinada, PETROFF, e gelose glycerinada em SABOURAUD.

11—10—927—As culturas se desenvolveram bem em batata e em PETROFF e em gelose glycerinada e no meio de conservação de SABOURAUD.

Nos esfregaços feitos com o material retirado dos tubos de PETROFF e conservação de SABOURAUD, foram vistos abundantes mycelios ao lado de bacillos acido-alcool-resistentes com bastonetes GRAM positivos.

Nesta data procedeu-se á repicagem desses tubos para meios proprios á tuberculose assim como tambem para meio de SABOURAUD. Neste ultimo meio desenvolveu-se uma cultura de actinomyces.

30—11—927—As sementes depostas nos balões em 21—3—927, foram retiradas e inoculadas em 8 cobayas, obedecendo á seguinte serie:

Balão n. 1. Tuberculose renal + cogumelo actinomyces:—2 cobayas.

Balão n. 2. Tuberculose renal + cogumelo não caracterisado:—2 cobayas.

Balões III. IV. V e VI—com T. M. 1 e T. H. A.—caldos estereis, limpidos:—2 cobayas para cada balão.

Durante o mez de Dezembro morreram as cobayas correspondentes aos balões III e IV, sem lesões tuberculosas. As outras se conservaram vivas sem manifestações de doença até a data actual.

Dessas experiencias decorre que *o bacillo da tuberculose foi capaz de viver em latencia no interior do caldo de cultura, á temperatura ambiente e exposta á luz diffusa, sem se desenvolver, e supportando a concorrencia vital com o desenvolvimento de uma cultura de cogumelo durante o prazo minimo de 45 dias e maximo de 90 dias (até onde chegou a nossa observação), sem modificação de sua virulencia.*

Por outro lado foi elle acompanhado *em symbiose pelo actinomyces que tambem foi isolado da lesão do animal.*

Restava verificar se poderia ser tambem attribuida qualquer acção pathogenica a esse actinomyces.

Com esse fim procedeu-se á inoculação de uma cobaya com fragmento da cultura em SABOURAUD conservação (1º repique do tubo de PETROFF, onde fora semeado o pús da cobaya primitivamente infectada).

No animal infectado com o actinomyces houve desenvolvimento de tuberculose. Nos ganglios inguinaes foram encontrados numerosos bacillos de KOCH. Não foi encontrada nenhuma forma attribuivel ao actinomyces.

Uma verificação da cultura do actinomyces (2º repique) feita posteriormente mostrou a existencia de raros bastonetes acido-alcool-resistentes. Tratava-se por consequencia de resto de semente do tubo de PETROFF, passado para o meio de SABOURAUD. Uma cultura de actinomyces semeada em SABOURAUD (3º repique) não infectou a cobaya quando experimentada.

Assim, pois, o *actinomyces não apresentou poder pathogenico para a cobaya.*

A repicagem do balão "1" feita em 7—XII—927 para SABOURAUD deu desenvolvimento a uma cultura identica á que fôra obtida após a passagem desse cogumelo pelo organismo da cobaya.

Verificou-se assim experimentalmente o concorrencia vital de um germen não pathogenico com um germen pathogenico em symbiose nas condições normaes do meio exterior, symbiose que se manteve por passagem no organismo animal, conservando-se ambos os germens com os seus caracteristicos physio-pathologicos, isto é, um o seu poder pathogeno intacto (bacillo da tuberculose), o outro a sua não pathogenidade (actinomyces saprophyta).

As sementes mantidas nos balões de caldo até Novembro foram nessa data inoculadas em cobayas que se mostraram sem alteração de saude, nenhuma dellas se infectando.

Os tubos semeados com o pús da cobaya infectada por essa amostra de tuberculose deram desenvolvimento a magnificas culturas luxuriantes, todas porem dotadas de forte poder chromogeno. Quer os tubos de PETROFF, quer os de batata glycerinada ou os de gelose glycerinada, mostraram culturas coradas em róseo salmão mais ou menos accentuado, até a côr de vermelho tijolo, entremeiado com coloração creme.

É digno de nota e se deve accentuar *que a propriedade chromogena mostrou-se neste caso independente do constituição chimica do meio. Do mesmo modo, não esteve ella ligada á edade da cultura do laboratorio, por isso que foi verificada nessa amostra immediatamente depois da passagem pelo organismo da cobaya,* quando anteriormente essa amostra não tinha poder chromogeno accentuado e que tambem não se manifestou nas culturas subsequentes áquellas obtidas após isolamento do germem do pús tuberculoso.

Os preparados microscopicos dessas culturas são tambem muito interessantes.

Nelles se observou a predominancia de formas em streptothrix.

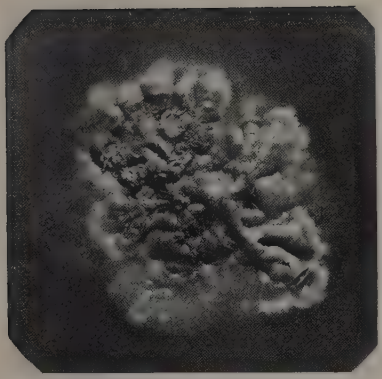
DISCUSSÃO.

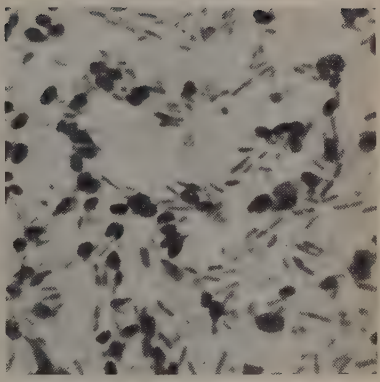
As experiencias acima relatadas nos suggerem considerações de valor pratico.

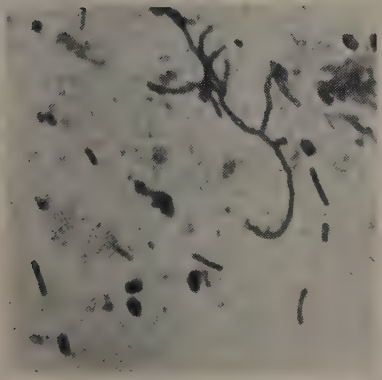
A possibilidade do bacillo da tuberculose se manter em estado de vida latente durante o prazo de 2 annos e 7 mezes, recobrando sua vitalidade pela addição de elementos nutritivos que asseguravam ainda a conservação da vida da cultura original ao cabo de 3 annos e 5 mezes, falla muito alto em favor da grande resistencia do virus tuberculoso ás causas dysgeneticas do meio exterior.

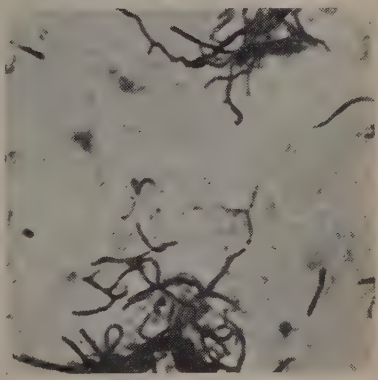
Esta condição de resistencia e de vida latente ainda se tornou mais patente na serie experimental III.

Desta serie se conclue que a contaminação accidental por um actinomyces não se oppoz á vida symbiotica desse cogumelo com o bacillo de KOCH, conservando cada especie suas caracteristicas biologicas, a saber: não pathogenidade do actinomyces e a pathogenidade e virulencia do bacillo da tuberculose. *Essas experiencias nos mostraram, pois, que devemos manter grandes reservas sobre a destruição do virus tuberculoso pelas condi-*









Phots. J. Pinto.

Fig. 1—Actinomyces não pathogeno para a cobaya. Cultura de 3 mezes em meio de conservação SABOURAUD.

Fig. 2—Microphotographia de um esfregaço desta cultura. Col. Methodo de GRAM.

Fig. 3—Actinomyces e bacillo da Tuberculose—Esfregaço de cultura mixta em PETROFF—Col. pelo Methodo de FONTES.

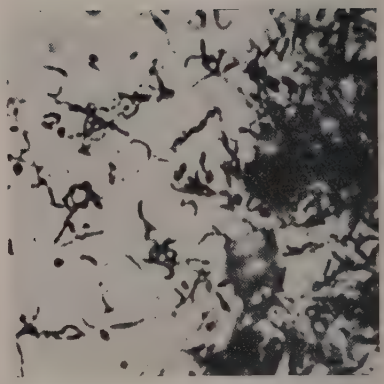
Fig. 4—Id. idem em batata glycerinada. Formas actinomycosicas acido-al cool-resistentes fortemente granulosas

Fig. 1—*Strahlenpilz* nicht pathogen fuer Meerschweinchen. Kultur in SABOURAUD's Konservierungsnaehrboden. Kultur von 3 Monaten.

Fig. 2—Mikrophotographie eines Ausstriches dieser Kultur. Faerbung: GRAM's-Methode.

Fig. 3—Strahlenpilz und Tuberkelbacillus. Ausstrich einer gemischten Kultur in PETROFF. Faerbung: Durch FONTES Methode.

Fig. 4—Id. id. in glycerinierter Kartoffel. Saeure-alkoholfeste Strahlenpilzformen stark granulose.



Phots. J. Pinto.

Fig. 5—Esfregaço de cultura em PETROFF do bacillo acido-alcool-resistente isolado de pus do ganglio de cobaya que succumbiu por tuberculose generalizada – Bac. acido-alcool-resistente fortemente granuloso. Pelo Methodo de FONTES.

Fig. 6—Id. id. Cultura em batata glycerinada.

Fig. 5—Ausstrich einer Kultur in PETROFF von saeure-alkoholfesten Bacillus, isoliert von Ganglien-Eiter eines an generalisierte Tuberkulose gestorbenen Meerschweinchens. Saeure-alkoholfester Bacillus stark granulose. Durch FONTES'-Methode.

Fig. 6—Id. id. Kultur auf glycerinierter Kartoffel.

Fig. 7 Fig. 8 Castro Silva, del.

Fig 7 Cultura de tuberculose chromogena, isolada de pús de cobaya—Meio de PETROFF.
Fig 8—A mesma cultura em batata glycerinada.

Fig. 7 Kultur von chromogener Tuberkulose, isoliert aus dem Eiter eines Meerschweinchens.—PETROFF'sches Medium.
Fig. 8—Dieselbe Kultur auf Glyzerin-Kartoffel.

ções dysgeneticas do meio exterior, e nos fazem pensar na possibilida de de infecções originarias de meios infectados.

CONCLUSÕES.

O virus da tuberculose póde se manter em latencia de vida por prazo superior a 2 annos e 7 mezes, e viver em symbiose com um cogumelo não pathogeno por prazo de 90 dias, sujeito ás condições normaes do meio ambiente (acção da temperatura e da luz). Neste ultimo caso o virus não perdeu a sua virulencia nem a sua pathogenidade.

Einige Beobachtungen ueber den Tuberkelbazillus und seine experimentellen Beziehungen zu dem Saprophytismus nahestehenden Bedingungen

Von Dr. A. FONTES und Dr. J. BARBOSA DA CUNHA.

Seit 1923 beschaeftigt sich einer von uns mit der Untersuchung der Entwicklung des Tuberkelbazillus unter Zuechtung desselben auf kuenstlichen Naehrboeden, mit der Absicht, die Kultur des Virus in granulaerer Form zu erlangen und ferner die Moeglichkeit festzustellen. das tuberkuloese Virus mit seinen krankheitsverursachenden Eigenschaften zu konservieren, selbst wenn es unter dem Saprophytismus nahestehenden Bedingungen gesetzt wird.

I

Alte Laboratoriums Kulturen von Gefluegel—Papageien-und Rindertuberkulose mit fuenfmonatlicher Entwicklung in fuenfprozentiger Glyzerin-Gelose wurden am 5. 12. 23 auf sechsprozentigen SABOURAUD'schen Maltose und Maltose-Glyzerin Naehrboden ueberpflanzt. Die Kulturen entwickelten sich reichlich in den mit Glyzerin beschickten Roehrchen, spaerlicher in den ohne Glyzerin. Die ausgesaeten Proben zeigten das gleiche Verhalten, wobei es nicht moeglich war einen bemerkenswerten Unterschied in der Entwicklung der betreffenden Proben bei Vergleichung mit denselben Naehrboeden festzustellen. (Beobachtung von 11. 8. 23).

An diesem letztem Datum wurde eine neue Ueberimpfung auf die gleichen Naehrboeden vorgenommen, wobei ein Monat hernach weit reichlichere Kulturen als bei der ersten Ueberimpfung zur Beobachtung kamen. Diese Kulturen wurden bis April 1924 aufbewahrt, als wir die Untersuchung vermittels neuer Reihen begannen, wozu wir die aeltesten in der Sammlung des Instituts vorraetigen Proben heranzogen. Unter diesen verdient besonders hervorgehoben zu werden die Probe T. M. 1. (typus humanus), die bei diese Gelegenheit ungefaehr auf 25 Jahre verteilte aufeinanderfolgende Uebertragungen auf kuenstliche Naehrboeden, ohne Tierpassage zaehlte und die ihre gesammte Virulenz und ihre klassischen morphologischen und kulturellen Charaktereigenschaften bewahrte.

Nicht nur diese Probe, sondern noch eine weitere des Typus humanus (T. M. 4), ferner solche vom Typus bovinus wurden konserviert durch aufeinanderfolgende Ueberimpfungen auf SABOURAUD'sche Maltose, Glyzerin-Maltose—Glykose und Glyzerin—Glykose Naehrboeden, durch Aufbewahrung in Glyzerin und Glyzerin-Gelose bis Oktober 1924, ohne hervortretende Unterchiede in der Entwicklung der Kulturen oder in der Virulenz der Proben sich bemerkbar machten.

Durch wiederholte Pruefungen ergab sich, dass diese Proben ihre mehr oder weniger granulierte Staebchenform, ihre ziemlich ausgepraegte Saeure-Resistenz und ihre wenig veraenderte Virulenz stets bewahrten. Das

gleiche war der Fall bei durch wiederholte Ueberimpfungen auf fluessige Naehrboeden von dem SABOURAUD'schen Verfahren aehnlicher Zusammensetzung (mit Ausschluss von Gelose) erhaltenen Kulturen, ferner bei Kulturen, die auf zur Bereitung der Vakzine gegen den Carbonulus symptomaticus angewandtem Naehrboeden gewonnen wurden, dieser letztere Naehrboden ist der Abschwaechung dieses Keimes ausserordentlich guenstig und besteht aus Fleischbouillon. Pferdeserum und Glykose.

Auch hiebei entwickelten sich die ausgesaeten Proben der Tuberkulose ohne bemerkenswerte Abschwaechung ihrer Virulenz und ohne offensichtliche Veraenderung ihrer Morphologie und ihrer kulturellen Charaktereigenschaften. (Beobachtungen vom 8 September 1924).

II

Einige der Roehrchen mit Kulturen in SABOURAUD'schen Maltose, Glyzerin-Maltose und Glykose-Maltose-Naehrboeden wurden ausserhalb des Brutofens diffusem Licht ausgesetzt, wobei die Roehrchen ohne irgend welche Ueberimpfung nur mit einem einfachen Stopfkorken verschlossen worden sind. So verblieben diese Kulturen vom August 1924 bis November 1926, worauf dann Ueberimpfung auf neue SABOURAUD'sche Roehrchen vorgenommen wurden.

Die Saat entwickelte sich nicht in den ueberimpften Roehrchen, die im Brutofen 45 Tage lang aufbewahrt wurden.

Es wurden hernach den urspruenglichen Roehrchen etwas einfache Naehrbouillon zugesetzt und dieselben dann im Brutofen bis Februar 1927 belassen. An diesem Zeitpunkt zeitigte die Probe T. M. 1 durch Aussaat auf SABOURAUD'schen Glykose-Naehrboden und nach erneuter Ueberimpfung die Entwicklung gewaltiger Kulturen von Alkohol-Saeure-resistenter Tuberkelbazillen.

Am 5. Januar 1928 wurde eine neue Ueberimpfung der Saat des im August 1924 besaeten Originalroehrchens T. M. I. vorgenommen, wobei eine reichliche Entwicklung in allen beschickten Roehrchen zu Tage trat.

Die Lebensfaehigkeit der Saat auf SABOURAUD'schen Glykose-Naehrboden war also nach 3 Jahre und 5 Monaten noch erhalten.

Die uebrigen Proben zeigten keine weitere Entwicklung mehr.

Die oben erwaehnten Versuche beweisen die Moeglichkeit *den Tuberkelbazillus in latenter Lebensfaehigkeit auf kuenstlichen Naehrboeden waehrend 2 Jahren und 7 Monaten zu erhalten unter Wiedererlangung seiner Virulenz (im Sinne der Reproduktionsfaehigkeit) ohne dass er seine morphologische und kulturellen Charaktereigenschaften einbuesst, wozu genuegt, seiner Entwicklung guenstige Elemente vorzufinden, naemlich Waerme, Naehrboeden und Feuchtigkeit.*

III

Diese Untersuchungen liessen uns an die Moeglichkeit denken, festzustellen, ob der Tuberkelbazillus unter dem natuerlichen Saprophytismus nahestehenden Bedingungen lebensfaehig ist. Zu diesem Zwecke haben wir folgende Versuchsreihen angestellt worueber wir folgendes berichten:

21 Maerz 1927. Es wurden 2 Kolben mit 5%iger Glyzerin-Bouillon flaechenhaft mit Haeutchenkultur von T. M. R. beschickt (isolierte Probe vom menschlichem Urin, typus humanus), 2 Kolben mit Haeutchenkultur von T. H. A. (typus humanus aus Argentinien stammend) und 2 Kolben mit T. M. 1.

Die Kolben wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und der Wirkung diffusen Lichtes ausgesetzt.

In der ersten Woche hatten sich alle ausgesaeten Haeutchen auf den Boden der Kolben gesenkt.

5. 5. 27. In einem der mit T. M. R. beschickten Kolben (Kolben N. 1) diente die auf dem Boden befindliche Saat als Kern fuer die Entwicklung einer Pilzkultur (45 Tage nach der Aussaat gemachte Beobachtung).

22. 6. 27. An diesem Tage wurde ein Bruchteil der Aussaat des Kolbens N. 1, der eine Spur der Pilzkultur mit sich fuehrte, in etwas physiologischer Loesung emulsioniert und 2 Meerschweinchen eingeimpft.

Diese Meerschweinchen zeigten Cancer und entsprechende Druesenschwellungen innerhalb der gewoehnlichen Frist.

22. 8. 27. An diesem Tage wurde einem der Meerschweinchen eine Leistendruese stirpiert. Mikroskopische Ausstrichpraeparat dieser Druese liessen zahlreiche Alkohol-Saeure-resistente Bazillen und Pilzmycelien erkennen. Mit Eiter aus der Druese wurden Roehrchen mit Kartoffel-Glyzerin, mit PETROFF und Gelose-Glyzerin Naehrboeden beschickt.

11. 1. 27. Die Kulturen entwickelten sich gut auf Kartoffel, PETROFF, Gelose-Glyzerin und in dem SABOURAUD'schen Konservierungsmittel.

In den mit Material, das aus den Roehrchen mit PETROFF und SABOURAUD entnommen wurde, hergestellten Ausstrich-praeparaten wurden zahlreiche Myzelien neben Saeure-Alkohol resistenten Bazillen mit GRAM positiven Staebchen beobachtet.

An diesem Tage wurde die Ueberimpfung dieser Roehrchen auf fuer Tuberkulose geeignete Naehrboeden und gleichfalls auf SABOURAUD vorgenommen. Auf dem letztem Boden entwickelte sich eine Kultur von Aktinomyces.

30. 11. 27. Die am 21. 3. 27. in die Kolben gebrachten Saaten wurden entnommen und 2 Meerschweinchen damit geimpft, unter Einhaltung nachstehender Reihenfolge:

Kolben n. 1. Nierentuberkulose Aktinomyzes – Pilz – 2 Meerschweinchen.

Kolben n. 2. Nierentuberkulose nicht charakterisierter Pilz – 2 Meerschweinchen.

Kolben n. 3. 4. 5. 6. T. M. 1. und T. H. A. – klare sterile Bouillon – 2 Meerschweinchen fuer jeden Kolben.

Im Verlauf des Dezembers gingen die diesbezueglichen Meerschweinchen der Kolben 3 und 4 ohne tuberkulose Schaedigungen zu Grunde. Die uebrigen blieben am Leben, ohne bis heute irgendwelche Krankheitserscheinungen zu zeigen.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass der Tuberkelbazillus im Inneren der Naehrbouillon bei Zimmertemperatur und diffusem Licht ausgesetzt latent lebensfaehig bleibt, ohne sich zu entwickeln, wobei er die Lebensgemeinschaft mit der Entwicklung einer Pilzkultur fur eine Mindestfrist von 45

Tagen und für eine Hoechstfrist von 90 Tagen (bis dahin erstreckt sich unsere Beobachtung) ertraegt, ohne Veraenderung seiner Virulenz.

Anderseits wurde er in Symbiose mit Aktinomyces, der ebenfalls aus den geschaedigten Tierorganen isoliert wurde, angetroffen. Es eruebrigt sich noch festzustellen, ob irgend welche pathogene Wirkung diesem Aktinomyces zukommen.

Zu diesem Behufe wurde an die Impfung eines Meerschweinchens mit einem Bruchteil der in dem SABOURAUD'schen Konservierungsmittel angelegten Kultur gegangen. (erste Ueberimpfung auf PETROFF Roehrchen, wo der Eiter des ursprünglich infizierten Meerschweinchens ausgesaet worden war.)

In dem durch Aktinomyces infizierten Tier hatte Entwicklung der Tuberkulose stattgefunden. In den Inguinaldruesen wurden zahlreiche KOCH'sche Bazillen angetroffen. Es wurde keine auf Aktinomyzes sich beziehende Form vorgefunden.

Eine nachher vorgenommene Untersuchung der Aktinomyces-Kultur (zweite Ueberimpfung) zeigte die Anwesenheit spaerlicher, Saeure-Alkoholresistenter Staebchen. Es handelte sich folglich um Reste der Aussaat des PETROFF Roehrchens, die auf SABOURAUD'sches Konservierungsmittel uebertragen worden war. Eine auf SABOURAUD ausgesaete Aktinomyces-Kultur (dritte Ueberimpfung) hat das Meerschweinchen bei einem diesbezueglichen Versuche nicht infiziert.

Daraus folgt, dass der *Aktinomyces keinen krankheitserregenden Einfluss auf Meerschweinchen ausuebt.*

Die Ueberimpfung aus Kolben n. 1 vom 7. 12. 27. auf SABOURAUD gab Anlass zur Entwicklung einer identischen Kultur, wie sie nach Passage dieses Pilzes durch den Organismus des Meerschweinchens erhalten worden war.

Es wurde auf diese Weise die vitale Gemeinschaft eines nicht pathogenen Keimes mit einem pathogenen Keime in Symbiose unter normalen Bedingungen der Aussenwelt festgestellt, eine Symbiose, die bei Passage im tierischen Organismus erhalten bleibt, wobei beide Keime ihre physiologisch-pathologischen Charaktereigenschaften, naemlich der erste, seine intakte pathogene Wirkung (Tuberkelbazillus) und der zweite seine Nichtpathogenitaet (saprophytischer Aktinomyces) bewahrten.

Die in den Kolben mit Bouillon bis November unterhaltenen Saaten wurden um diese Zeit auf Meerschweinchen geimpft, die ohne irgendwelche Schaedigung und ohne Infektion diese Impfung ueberstanden.

IV

Die mit dem Eiter des durch die Probe von Tuberkulose infizierten Meerschweinchens beschickten Roehrchen fuehrten zur Entwicklung von grossartigen ausgedehnten Kulturen, die jedoch alle durch starke chromogene Eigenschaft sich auszeichneten. Sowohl die PETROFF-Roehrchen als die mit Kartoffel-Glyzerin oder Gelose-Glyzerin bereiteten Naehrboeden zeigten die Kulturen in einer lachsrosaroten Faerbung, die mehr oder weniger bis Ziegelsteinfarbe mit dazwischengeschichteter cremeartiger Faerbung sich verdichtete.

Es ist bemerkenswert und verdient hervorgehoben zu werden, *dass die chromogene Eigenschaft sich in diesem Fall unabhaengig von der chemischen Konstitution des Milieus erwies. Sie stand gleichfalls in keiner Beziehung zum Alter der Laboratoriums-kulturen, weil sie in dieser Probe unmittelbar nach der Passage durch den Organismus des Meerschweinchens festgestellt wurde*, wechrend vorher diese Probe keine ausgepraegte chromogene Eigenschaft hatte, die auch in den Kulturen, die auf jene nach Isolierung des Keimes aus dem tuberkulosen Eiter folgten, nicht zutage trat.

Die mikroskopischen Praeparate dieser Kulturen sind ebenfalls sehr interessant.

Man beobachtete hierbei das Vmajorwiegen von Formen von Streptothrix.

DISKUSSION:

Die eben berichteten Untersuchungen draengen uns Betrachtungen praktischen Werts auf.

Die Moeglichkeit, dass der Tuberkelbazillus im latenten Lebenszustande waehrend einer Zeit von 2 Jahren und 7 Monaten sich haelt, wobei er seine Vitalitaet durch Zusetzen von naehrenden Elementen wieder erlangt, die weiter die Erhaltung des Lebens der urspruenglichen Kultur bis zum Ablauf von 3 Jahren und 5 Monaten sicherten, spricht laut und deutlich fuer die grosse Widerstandskraft des tuberkuloesen Virus gegen dysgenetische Ursachen der Aussenwelt.

Dieses Verhalten der Widerstandskraft und des latenten Lebens wurde noch offensichtlicher in der Versuchsreihe 3.

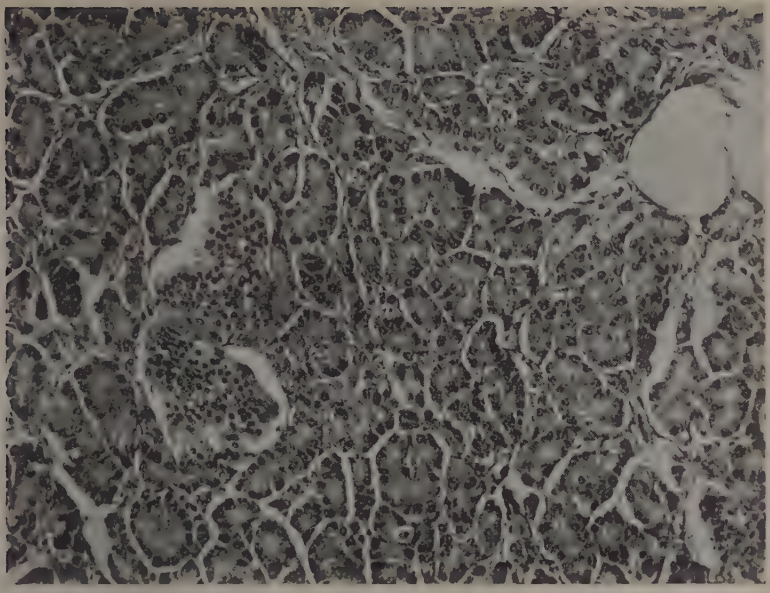
Aus dieser Reihe folgt, dass die zufaellige Ansteckung mit Aktinomyces dem symbiotischen Leben dieses Pilzes mit dem KOCH'schen Bazillus keinen Abbruch tut, wobei jede Art ihre biologischen Charaktereigenschaften beibehaelt, naemlich:

Die Nichtpathogenitaet des Aktinomyces und die Pathogenitaet und Virulenz des Tuberkelbazillus.

Diese Untersuchungen zeigten uns also, dass wir uns streng reserviert verhalten muessen gegenueber der Zerstoerung des tuberkuloesen Virus durch dysgenetische Verhaeltnisse der Aussenwelt und ausserdem lassen uns diese Untersuchungen an die Moeglichkeit von aus infiziertem Milieu stammenden Infektionen denken.

SCHLUSSFOLGERUNG.

Das Tuberkulose—Virus vermag in latentem Lebenszustande fuer eine Zeit von ueber 2 Jahren und 7 Monaten sich zu erhalten und in Symbiose mit einem nicht pathogenen Pilz bis zu 90 Tage zu leben, wenn er normalen Verhaeltnissen der Umgebung ausgesetzt wird. (Temperatur und Lichteinfluss). In diesem letzteren Falle hat das Virus weder seine Virulenz noch seine Pathogenitaet eingebuesst.



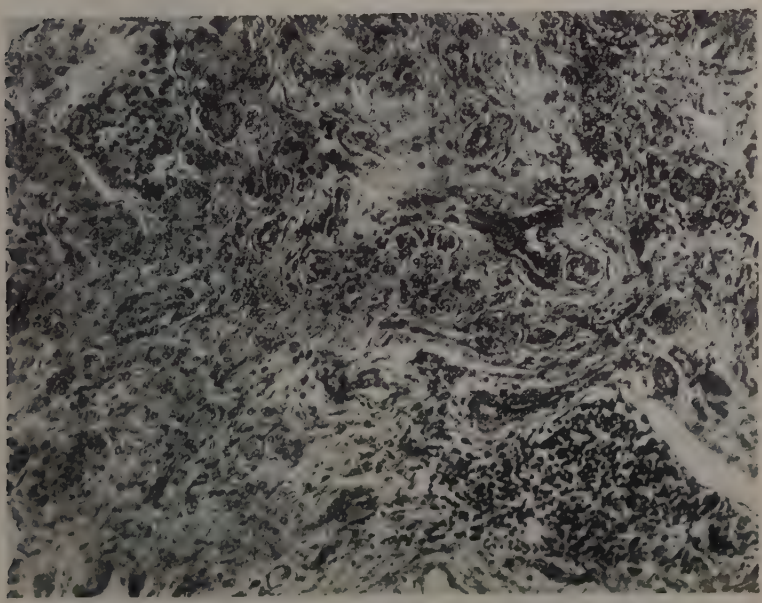
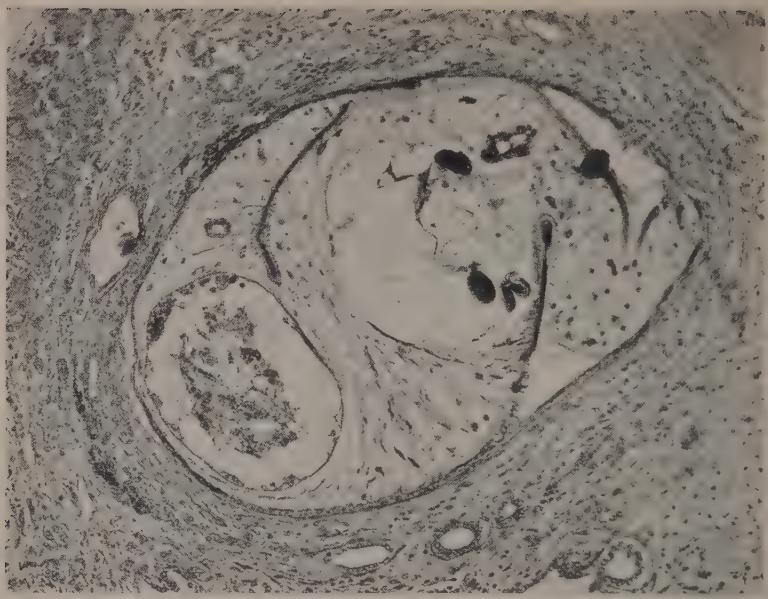


Fig. 1—Pancreas : zonas normaes. Phots. J. Pinto
Fig. 2—Pancreatite intersticial chronica. Infiltrações lymphocytarias.



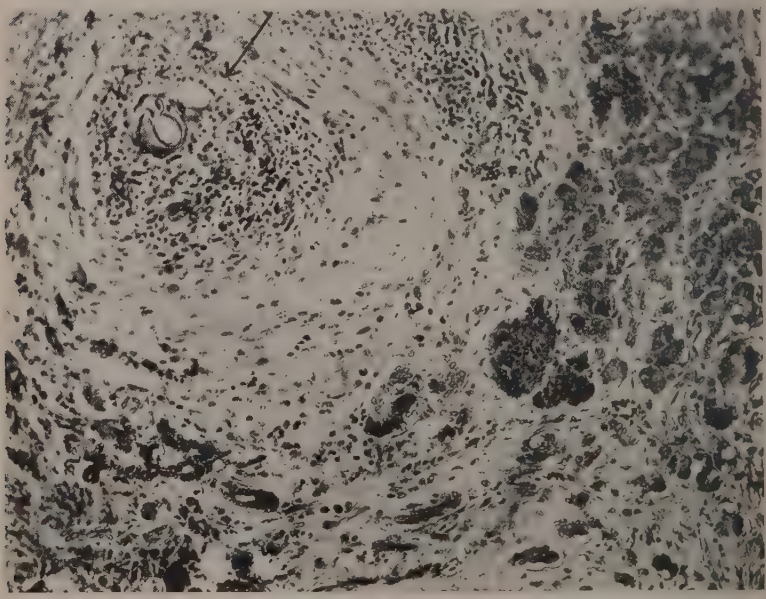


Fig. 3—Pancreas. O *Eurytrema pancreaticum* dentro de um canaliculo excretor
Fig. 4—Ovos do parasito Reacção fibrosa e cellulas gigantes, typo de corpo extranho.

Phots. J. Pinto

Sobre as lesões do pancreas de boi produzidas pelo EURYTREMA PANCREATICUM.

Pelo Dr. C. BURLE DE FIGUEIREDO.

A secção de anatomia pathologica recebeu do Dr. LAURO TRAVASSOS fragmentos de pancreas de boi, fixados em formol a 10 %, para descripção das lesões nelles encontradas, produzidas pelo *Eurytrema pancreaticum*.

Feita a inclusão em paraffina, foram os blócos cortados em série, e os cortes, de 3 a 4 *micra* de espessura, corados pela hematoxylina-eosina. Ao exame pudémos encontrar, com facilidade, o parasito em differentes pontos, como tambem ovos, disseminadamente. As lesões encontradas são as de uma pancreatite intersticial chronica, processo inflammatorio chronico, circumscripto, com producção, em alguns fócos, de cellulas gigantes do typo de corpo extranho.

Como bem mostra a microphotographia n. 1, encontram-se zonas nas quaes o aspecto normal do pancreas é conservado, vendo-se nitidamente os *acini* glandulares e as ilhotas de LANGERHANS perfeitamente conservadas.

A microphotographia n. 2 mostra o aspecto da maior parte do material, que é constituido por proliferação de tecido conjunctivo, acarretando a destruição dos *acini* glandulares com conservação das ilhotas de LANGERHANS, e infiltrações lymphocytarias. Este aspecto é observado ao redor dos pontos onde são encontrados os parasitos, como tambem, em reacção em torno dos ovos, que se acham no parenchyma pancreatico.

Destes dois aspectos, n. I e II, podemos deduzir que a extensão das lesões depende do grão de infestação, que no nosso caso é bastante avançada, e que a funcção de secreção interna é conservada e só alterada remotamente, pela extensão do processo. A localização do parasito no pancreas é evidenciada com a gravura n. 3. Elle se encontra dentro de canaliculos excretores, como se vê bem pelo epithelio que o reveste, em espaço deixado pelo parasito em uma de suas curvas naturaes. Nesta mesma microphotographia observa-se dilatação dos canaliculos excretores, devido á obstrucção, por parasitos, de canaes maiores. A photographia n. 4 mostra os ovos com reacção em torno e producção de cellulas gigantes do typo de corpo extranho.

Ceratopogonineos ectoparasitos de phasmideos.

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

(Com 5 figuras)

Ha algum tempo o meu presado collega frei THOMAZ BORGMEIER entregou-me um exemplar de um diptero de aspecto curioso, apanhado por J. F. ZIKAN em São Gabriel (alto do Rio Negro), a 11 de Outubro de 1927, sobre um phasmideo não determinado.

Ao receber o material verifiquei tratar-se de uma ceratopogonineo do genero *Forcipomyia* (fam. Chironomidae).

Ulteriormente, feitas as necessarias pesquizas bibliographicas, verifiquei que a especie ainda não havia sido descripta. Achando-me nessa occasião occupado com outros trabalhos, deixei para mais tarde a confecção de uma nota sobre o insecto, principalmente para assignalar o parasitismo do mesmo sobre phasmideos (bichos-páo), facto até então desconhecido.

Mal começára a descrever esta nota, quando, lendo o ultimo numero dos *Annales de Parasitologie*, T. VI, n. 3, 1er. Juillet 1928, deparei com um artigo de FIEBRIG-GERTZ intitulado: Un diptère ectoparasite sur un phasmide: *Ceratopogon ixodoides* n. sp.

Lendo-o rapidamente, tive a principio a impressão de que o autor encontrára o mesmo insecto que me fora dado por BORGMEIER, não sómente pela identidade de habitos, como pelo aspecto geral do corpo. Entretanto, a julgar pela descripção e pelo desenho das antennas que FIEBRIG-GERTZ apresenta para o seu *Ceratopogon* (que aliás deve ser uma *Forcipomyia*), creio ser differente a especie por mim estudada.

A parte do trabalho de FIEBRIG-GERTZ sobre os habitos do *Ceratopogon ixodoides* é original e bem interessante. De facto esse autor, pela primeira vez, estudou com algum detalhe um ceratopogonineo cujas femeas vivem agarradas, como carrapatos, ao dorso de um phasmideo e sempre em lugares de facil accesso (articulações dos segmentos, visinhança dos estigmas, etc.). Em cada phasmideo elle encontrou 10 e mesmo um maior numero de exemplares. Chamou tambem attenção para o extraordinario desenvolvimento do abdomen do insecto, que attinge as mesmas proporções de uma femea de *Tunga* (bicho de pé) por occasião da maturidade. A analogia com a *Tunga*, como diz o autor, é completa, pois o referido parasito permanece fixado ao hospedeiro até o momento da maturidade dos ovos. E quando o abandona, como se observa com os carrapatos, acha-se quasi completamente transformado em um sacco de ovos.

Como disse, foi FIEBRIG-GERTZ quem, pela primeira vez, descreveu com certo detalhe este caso interessante de parasitismo. Todavia em 1908 WILLISTON, em seu *Manual of North American Diptera* (p. 147), menciona um peqneno diptero encontrado nas Antilhas "closely applied to and sucking the juices from the antenna of a phasmid". Elle o considerou

Fig. 1 - *Forcipomyia obesa* ♀ × 27.

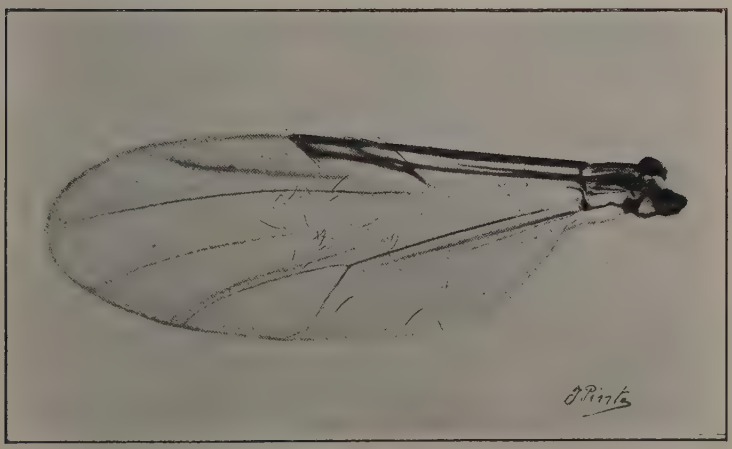


Fig. 2—Aza de *F. obesa*; × 56,5.

Fig. 3—Antenna de *F. obesa* ; × 94.

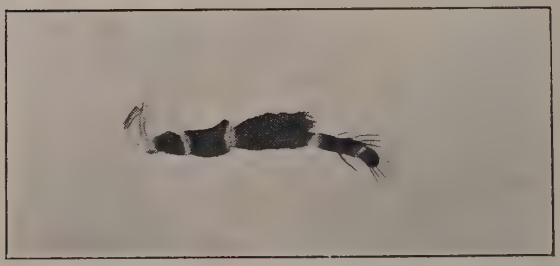


Fig. 4—Palpo de *F. obesa* ; × 94.

Fig. 5 –Palpo de *F. obesa*.

como representante de um novo genero da fam. Simuliidae, porem, as figuras que apresentou, como bem pondera EDWARDS (*), indicam antes tratar-se de um ceratopogonineo. Aliás, como adianta EDWARDS, nada mais se soube relativamente a esse especimen, provavelmente perdido, pois não se o encontra nem nas collecções de material das Antilhas do British Museum, estudadas por WILLISTON, nem nas deste autor, que se acham em Washington e em New York.

Feitas estas considerações, passo a analysar os caracteres que, no especimen colhido por ZIKAN, não estão de accôrdo com os de *Ceratopogon ixodoides*.

Nesta especie as antennas, como descreve e figura o autor, são pouco mais compridas que o diametro da cabeça e apresentam, do torus ao segmento apical, 13 segmentos, contando-se apenas 4 alongados. Diz ainda FIEBRIG-GERTZ que toda a superficie da antenna, exceptuando o torus, é coberta de pellos finos, um pouco mais alongados nos segmentos basilares. Alem disso o comprimento desses pellos não excede muito ao diametro dos segmentos. Ora, se as antennas examinadas por FIEBRIG-GERTZ estavam perfeitas, só pelo aspecto destes orgãos a especie que estudei deve ser differente, como se pode verificar examinando a microphotographia n. 3.

As azas de *C. ixodoides*, embora mal representadas, parecem tambem ser differentes das do nosso especimen.

Os palpos, igualmente parecem apresentar aspecto diverso. Sobre esse orgão diz FIEBRIG-GERTZ o seguinte: "Les palpes sont trianticulés. L'article basal est aussi long que les trois autres et deux fois plus volumineux. Ils sont densément couverts de poils fins et assez longs, plus longs que ceux des antennes". Eu não sei bem a que articulo basal se refere o autor, se ao 3º ou si ao conjuncto dos 2 primeiros basaes, pois, neste grupo, os palpos sempre apresentam 5 segmentos. No exemplar que estudei, o 3º tem a abertura da escavação sensorial numa saliencia em tronco de cone perto do apice do segmento. Tal orgão tem sido assignalado por varios autores em varias especies de Ceratopogoninae e aqui mesmo LUTZ (**), que publicou varios e notaveis artigos sobre os nossos ceratopogonineos, teve o ensejo de o estudar em algumas especies.

São estas as differenças que se observam no nosso especimen, comparando-o com a descripção e figuras de *C. ixodoides*.

No mais, ha semelhança perfeita entre os 2 insectos. Si, pois, o aspecto de *C. ixodoides* é exactamente como foi descripto por FIEBRIG-GERTZ, é evidente que a nossa *Forcipomyia* representa o typo de uma outra especie, para a qual proponho, no caso de FIEBRIG confirmar as differenças por mim observadas, o nome de *Forcipomyia obesa*.

O holotypo é representado pelo especimen unico que possuimos, montado na lamina n. 500. A antenna, a aza e o palpo do mesmo insecto acham-se montados nas preparações nrs. 501 e 502, da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

Manguinhos, Agosto de 1928.

(*) EDWARDS, F. M. New and old observations on ceratopogonine midges attacking other insects. Ann. Trop. Med. and Parasit., 1923, XVII, p. 28.

(**) LUTZ, A.—Contribuição para o estudo das Ceratopogoninas hematofagas do Brasil. Parte sistematica. Segunda Memoria. Mem. Inst. Osw. Cruz, 1913, Vol. I, pp. 45-72.

Sobre o conteúdo gorduroso do pulmão humano (*)

Por A. PENNA DE AZEVEDO.

A questão do conteúdo gorduroso do pulmão tem despertado interesse entre os pesquizadores, achando-se ligada, entre outras, á questão da lipodiérese pulmonar, posta em foco, recentemente, por ROGER.

Já em 1905, GILBERT e JOMIER evidenciavam em côrtes de pulmão de cães normaes, submettidos a diversos regimes, fixados na mistura forte chromo-osmio-acetica de FLEMMING, grandes massas de côr negra e aspecto irregular, localizadas no interior dos capillares sanguineos.

Esses mesmos aspectos eram vistos quando se injectava, na veia saphena do animal, uma emulsão gordurosa. Correspondiam a granulos gordurosos que haviam reduzido o acido osmico.

O pulmão normal, segundo esses autores, apresentaria então, grandes massas gordurosas intracapillares, semelhantes ás descriptas na embolia gordurosa pulmonar. A gordura entretanto, não se localizaria apenas no interior dos capillares pulmonares, sob a fórma de blocos coalescentes, mas infiltraria tambem, elementos especiaes, repartidos indistinctamente em todo o orgão, existindo no tecido cellulo-adiposo e nas cellulas dos nodulos cartilaginosos que envolvem os bronchios.

No epithelio bronchico, as granulações existiriam em abundancia.

GRANEL, examinando o epithelio dos alveolos e as ultimas ramificações bronchicas, no rato, chegou á conclusão de que as cellulas do epithelio contem reservas gordurosas em abundancia, que se evidenciam pela fixação no CIACCIO, sendo coraveis pelo sudan III. Principalmente nas pequenas cellulas nucleadas, o protoplasma é rico em granulações sudanophilas. Esse mesmo aspecto apparece ao nivel das cellulas epitheliaes das ultimas ramificações bronchicas, apenas em quantidade muito menor. Para GRANEL, existe uma transformação dos chondriocontos em "plastes" gordurosas.

FAURÉ-FREMIET affirma que a cellula nucleada pulmonar no adulto (cão, coelho, cobaya), contem granulos refringentes, coraveis pelo sudan ou pelo indophenol, granulos esses que apresentam os caracteres de solubilidade dos corpos gordurosos, não permittindo nenhum fixador a sua conservação em material incluido em paraffina, sendo elle assim, de opinião que esses granulos da cellula granulosa sejam constituidos por cholesterina.

Dizem ROGER, BINET e VERNE que, normalmente, algumas cellulas do pulmão encerram accumulações lipoidicas.

WENSLAW, que recentemente publicou trabalhos sobre tal assumpto, examinou o conteúdo gorduroso do pulmão em varias classes de animaes (batrachios, repteis, aves e mammiferos) e tambem o material colhido de

(*) Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz, laboratorio do Dr. C. MAGARINOS TORRES.

um recem-nascido (morto em asphyxia branca), chegando a conclusões deveras interessantes.

Assim o exame de um córte fresco de pulmão, em congelação, sem fixação, permittio-lhe o encontro de cellulas cubicas do epithelio pulmonar, encerrando numerosos grãos brilhantes, de dimensões diversas. Esses grãos podem ser corados pelo sulfato de azul de Nilo. O methodo de CIACCIO conserva-os, apparecendo elles corados em amarello-ouro. O methodo de SMITH-DIETRICH dá-lhes uma coloração cinzenta escura ou negra. Acha WENSLAW que a colloração pelo sudan não é bôa, sendo elles de facil dissolução. Prefere fixar os fragmentos em formol salgado, corando depois em massa pela hematoxylina de BÖHMER. O methodo de SCHULTZ-WINDAUS para a cholesterina e o de FISCHER, não deram resultado ao autor.

Estabelece WENSLAW que as cellulas nucleadas do epithelio pulmonar contêm, de modo normal, grãos lipoidicos especiaes, muito labeis, apresentando os mesmos caracteres nos batrachios, repteis, aves e mammiferos. Em virtude de algumas de suas propriedades conclue WENSLAW que são verdadeiros lipoides (phosphatides) e devem estar relacionados com o exercicio de uma importante funcção.

JAULMES referindo-se á estructura da pequena cellula granulosa do pulmão, affirma que no protoplasma dessas cellulas existem granulações pouco refringentes, de natureza mitochondrial e outras muito refringentes, de dimensões variaveis, que são globulos gordurosos, coraveis pelo sudan.

Interessados pela questão, resolvemos realizar, a nosso turno, investigações pessoaes, aproveitando material humano do qual, dispunhamos, em abundancia, no Serviço de Anatomia Pathologica do Hospital Geral de Assistencia, do Rio de Janeiro.

O material de que nos servimos, consta de 14 casos de autopsia, divididos em tres grupos differentes. Um delles comprehende aquelles em que o pulmão era de aspecto normal; um outro, em que predominavam alterações inflammatorias (bronchopneumonia, pneumonia); e finalmente um ultimo grupo em que existiam, de modo quasi exclusivo, alterações circulatorias (edema e hyperemia chronica passiva). Os primeiros resultados que aqui passamos a relatar, foram conseguidos, apenas, com o methodo de fixação em formol salgado e coloração pelo sudan III, em solução saturada no alcool a 70º.

No grupo constituido por pulmões apparentemente normaes, o conteúdo gorduroso é muito discreto, existindo escassos granulos nas cellulas da parede alveolar, sendo mesmo raros os elementos que encerram essas granulações sudanophilas. No tecido conjunctivo peribronchico existem tambem, elementos cellulares, contendo granulações alaranjadas. Do mesmo modo que na parede alveolar, aqui, as cellulas de conteúdo gorduroso são muito escassas. No interior dos capillares, bem como no endothelio de suas paredes, não existem granulações coradas pelo sudan. De modo algum encontramos massas gordurosas ou embolias gordurosas capillares semelhantes ás que GILBERT e JOMIER descreveram no cão.

No grupo de casos em que predominavam as alterações inflammatorias, o conteúdo gorduroso é bastante augmentado, parecendo achar-se, ás vezes, em relação directa com a intensidade do processo inflammatorio.

Assim é que as cellulas da parede alveolar e os elementos do tecido conjunctivo peribronchico mostram granulações gordurosas, mais ou menos abundantes e de volume variavel. Elementos do exsudado (macrophagos e polymorphonucleares) e cellulas epitheliaes descamadas contem, egualmente, granulações gordurosas, em geral volumosas.

Nos casos em que o pulmão era séde de alterações circulatorias, o conteúdo gorduroso do parenchyma pulmonar soffreu pouca modificação, muito se approximando do aspecto evidenciado nos casos normaes. Ao passo que as cellulas epitheliaes, descamadas na luz dos alveolos, mostram numerosas gottas de gordura, os elementos da propria parede alveolar e do tecido conjunctivo peribronchico mostram granulações gordurosas pouco abundantes.

CASO 2639—M. L., Mulher de 53 annos de idade, branca, fallecida ás 2,15 horas do dia 3-7-928 e autopsiada ás 9 horas do mesmo dia.

O pulmão direito pesa 260 grs. e o esquerdo 210. Ambos têm aspecto normal, e superfície do córte sendo de côr rosea e secca. O estudo microscopico revela, na luz dos alveolos, algumas cellulas grandes, contendo granulações pequenas, alaranjadas (cellulas epitheliaes descamadas, monocytos), outras cellulas contendo granulações pardacentas (cellulas cardiacas). Na parede alveolar e tecido conjunctivo peribronchico, existem raras cellulas de conteúdo gorduroso. Existe anthracose.

CASO 4091—J. C. S. de 7 mezes de edade, sexo feminino, parda, brasileira, fallecida ás 8,50 horas do dia 8-5-928 e autopsiada ás 10 horas do mesmo dia.

Pulmão direito pesa 30 grs. e o esquerdo 25 grs. Mostram um processo discreto de bronchopneumonia. No tecido conjunctivo peribronchico, não são raras cellulas de conteúdo gorduroso, ás vezes proximas umas ás outras e geralmente volumosas. Na parede alveolar são egualmente encontradas cellulas de nucleo redondo e de conteúdo lipoidico (cellulas granulosas da parede alveolar). As granulações lipoidicas são de volume desigual, notando-se algumas grandes e outras pequenas. Não apparecem abundantes cellulas com particulas de carvão (anthracose).

CASO 4092 - N. P., de 3 annos de edade, sexo masculino, pardo, brasileiro, fallecido á 1,30 horas do dia 10-5-928 e autopsiado ás 9 horas do mesmo dia.

Pulmão direito pesa 85 grs. e o esquerdo 140 grs. Existem lesões de bronchopneumonia no esquerdo. Os elementos do exsudado inflammatorio mostram rico conteúdo gorduroso, especialmente, os macrophagos, o mesmo acontecendo com elementos do tecido conjunctivo peribronchico. As cellulas da parede alveolar contêm granulações alaranjadas, mais ou menos abundantes. Não são abundantes os elementos contendo particulas de carvão.

CASO 4097—M. S., de 1 anno de edade, sexo feminino, preta, brasileira, fallecida ás 23 horas do dia 30—5—928 e autopsiada ás 9 horas do dia seguinte.

Pulmão direito pesa 75 grs. e o esquerdo 65 grs. Ambos apresentam lesões de bronchopneumonia. No interior dos elementos do exsudado (macrophagos) e nos elementos do tecido conjunctivo peribronchico, existem numerosos granulos alaranjados.

Nas cellulas da parede alveolar, encontram-se granulações gordurosas. Não são abundantes cellulas contendo particulas de carvão.

CASO 5242 M. L. P., mulher de 41 annos de edade, parda, brasileira, fallecida ás 3,50 horas do dia 11-5-928 e autopsiada ás 10 horas do mesmo dia.

Ambos os pulmões pesam, cada um, 400 grs. As lesões constam de edema e hyperemia chronica passiva. Na luz dos alveolos, existem cellulas descamadas (epithelio monocytos), algumas contendo granulações alaranjadas, ás vezes muito pequenas e nitidas, outras vezes maiores e grosseiras; outras cellulas contêm pigmento pardacento (cellulas cardiacas). Cellulas contendo granulações negras, são vistas em determinadas regiões (anthracose). Na parede alveolar e no tecido conjunctivo peribronchico, são raros os elementos que contêm granulações sudanophilas.

CASO 5243 - A. F. S., mulher de 31 annos de edade, parda, brasileira, fallecida ás 13 horas do dia 10-5-928 e autopsiada ás 9 horas do 11-5-928.

Ambos os pulmões são levemente augmentados de volume e mostram alterações circulatorias (edema e hyperemia chronica passiva). Pelo estudo microscopico, são vistas cellulas na luz dos alveolos, contendo granulos gordurosos (cellulas epitheliaes descamadas, monocytos),

e outras encerrando pigmento pardacento (cellulas cardiacas). Na parede alveolar, existem cellulas pouco numerosas, contendo gordura, o mesmo acontecendo no tecido conjunctivo peribronchico. Existe anthracose.

CASO 5244—O. T., de 4 annos de edade, sexo feminino, parda, brasileira, fallecida ás 13 horas do dia 10-5-928 e autopsiada ás 9 horas do dia seguinte.

Pulmão direito pesa 90 grs. e o esquerdo 70 grs. Ambos têm aspecto normal. São rarissimas as cellulas da parede alveolar que contêm granulações gordurosas. Uma ou outra cellula das raras que existem na luz dos alveolos, mostra granulações sudanophilas. No tecido conjunctivo peribronchico, não se vê gordura. Existe anthracose.

CASO 5246—M. M. P., mulher de 20 annos de edade, branca, brasileira, fallecida ás 7,45 horas do dia 14-5.928 e autopsiada ás 9,30 do mesmo dia.

Pulmão direito pesa 340 grs. e o esquerdo 270 grs. Lesões de bronchopneumonia e hemorrhagias.

O exsudado (macrophagos) contem granulações gordurosas. Outras cellulas (cellulas cardiacas) contêm granulos pardacentos e outras apresentam particulas de carvão (anthracose). Algumas cellulas da parede alveolar contêm granulações sudanophilas. Os elementos do tecido conjunctivo peribronchico são pobres em gordura.

CASO 5247—Creança do sexo masculino que veio á luz em asphyxia branca, ás 7 horas do dia 15-6-928, tendo sido autopsiada ás 9 horas do dia immediato.

Pulmão direito pesa 20 grs., e o esquerdo 15 grs. Os fragmentos retirados dos lobos pulmonares, menos os do lobo inferior direito, sobrenadam. Os córtes histologicos revelam, em certas regiões, areas de atelectasia. Em outras porções, vêm-se rarissimas cellulas da parede alveolar contendo pequenos e escassos granulos alaranjados. No tecido conjunctivo peribronchico, são egualmente, raras as cellulas de conteúdo gorduroso.

CASO 5252—J. M. B., mulher de 21 annos de edade, branca, brasileira, falecida no dia 23-5-928 e autopsiada ás 9 horas do mesmo dia.

Pulmão direito pesa 260 grs., e o esquerdo 290 grs. Apresentam alterações de bronchopneumonia.

São vistas cellulas (cellulas epitheliaes descamadas, monocytos) na luz dos alveolos, contendo granulos gordurosos em abundancis, fóra das zonas inflammatorias. Os elementos do exsudado inflammatorio que contêm gordura não são abundantes e os que a encerram é sob a fórma de pequenos e distinctos granulos. Na parede alveolar, são poucas as cellulas de conteúdo gorduroso e no tecido conjunctivo peribronchico não ha cellulas com gordura. Existe anthracose.

CASO 5253—J. S., homem de 24 annos de edade, preto, brasileiro, fallecido ás 15 horas do dia 24-5-928 e autopsiado ás 9 horas do dia immediato.

Pulmão direito pesa 505 grs., e o esquerdo 400 grs. Ambos mostram edema e hyperemia chronica passiva. Existem cellulas descamadas na luz dos alveolos, sendo raras as que contem granulações gordurosas (cellulas epitheliaes descamadas, monocytos). Na parede alveolar, com raridade, encontram-se cellulas de granulações sudanophilas. No tecido conjunctivo peribronchico, não ha cellulas com gordura. Existem cellulas cardiacas e anthracose.

CASO 5254—J. A. C., homem de 23 annos de edade, pardo, brasileiro, fallecido ás 16 horas do dia 24-5-928 e autopsiado ás 9 horas do dia seguinte.

Pulmão direito pesa 405 grs., e o esquerdo 850 grs., apresentando pneumonia lobar. As cellulas do exsudado inflammatorio, especialmente os macrophagos, mostram um rico conteúdo gorduroso. As cellulas da parede alveolar assim como os elementos do tecido conjunctivo peribronchico, apresentam granulações, mais eu menos abundantes, coradas em alaranjado. Existem cellulas cardiacas e anthracose.

CASO 5255—L. X., mulher de 50 annos de edade, branca, polaca, fallecida ás 4,55 horas do dia 25—5—928 e autopsiada ás 9 horas do mesmo dia.

Pulmão direito pesa 360 grs., e o esquerdo 560 grs. Existem areas lobulares de consolidação pulmonar. Os elementos do exsudado (macrophagos) mostram rico conteúdo gorduroso. Nas cellulas da parede alveolar são encontradas granulações alaranjadas, abundantes, assim como nos elementos do tecido conjunctivo peribronchico. Existe anthracose.

CASO 5268—G. M. L., mulher de 42 annos de edade, parda, brasileira, fallecida ás 4 horas do dia 18—6—928 e autopsiada ás 9 horas do mesmo dia.

Pulmão direito pesa 470 grs., e o esquerdo 300 grs. Mostram edema e hyperemia chronica passiva. Na luz dos alveolos existem cellulas volumosas contendo granuiações gordurosas (cellulas epitheliaes descamadas, monocytos), ao lado de outras contendo particulas de côr negra (anthracose) ou granulos pardacentos (cellulas cardiacas). Na parede alveolar existem elementos eecerrando granulações sudanophilas, sendo raro encontrar-se no tecido conjunctivo peribronchico cellulas com granulos gordurosos.

Résumimos, nas seguintes conclusões, os resultados até agora conseguidos:

I—A cellula granulosa da parede alveolar do pulmão do homem contem, normalmente, granulações sudanophilas, pequenas e discretas.

II—O conteúdo gorduroso do pulmão é notavelmente augmentado em estados pathologicos, principalmente quando as lesões são de natureza inflammatoria.

Em taes estados as granulações gordurosas são não só mais abundantes, como apresentam maiores dimensões.

III—Em nenhuma das nossas observações conseguimos evidenciar globulos ou massas gordurosas coalescentes intracapillares, taes como foram verificadas no cão, por GILBERT e JOMIER.

LITTERATURA

FAURÉ-FREMIET—C. R. Soc. Biol., 1939, vol. 83, p. 1.
GILBERT (A) et JOMIER (J)—C. R. Soc. Biol., 1905, vol. 2, p. 39.
GILBERT (A) et JOMIER (J)—C. R. Soc. Biol., 1905, vol. 2, p. 87.
GILBERT (A) et JOMIER (J)—C. R. Soc. Biol., 1905, vol. 2, p. 89.
GRANEL (F)—C. R. Soc. Biol., 1919, vol. 82, p. 1329.
GRANEL (F)—C. R. Soc. Biol., 1919, vol. 82, p. 1367.
JAULMES (C)—Bull. d'Hist. appl. á la Phys. 1925, t. II, p. 192.
ROGER (H) BINET (L) et VERNE (J)—Journ. Phys. et Path. Gén. 1923, vol. 21, p. 461.
WENSLAW (A)—C. R. Soc. Biol., 1926, vol. 95, p. 700.
WENSLAW (A)—C. R. Soc. Biol., 1926, vol. 95, p. 702.
WENSLAW (A)—C. R. Soc. Biol., 1926, vol. 95, p. 1430.
WENSLAW (A)—C. R. Soc. Biol., 1927, vol. 97, p. 970.

Sobre algumas anophelinas encontradas no Brasil.

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

Sob a direcção do Dr. ALCIDES GODOY, chefe de serviço do Instituto Oswaldo Cruz, será brevemente inaugurada em Estrella, na baixada do Estado do Rio, uma estação experimental de malaria, onde poderão ser convenientemente estudadas as principaes questões relativas á epidemiologia e á prophylaxia dessa doença em nosso meio.

Do programma de pesquizas a serem effectuadas na referida estação consta o estudo da biologia e especialmente da ethologia de algumas das nossas anophelinas transmissoras do paludismo, sendo as mesmas observadas em condições as mais aproximadas possiveis das naturaes.

Antes de iniciar esse estudo, achou GODOY conveniente ficar preliminarmente elucidada a questão referente á systematica de taes insectos.

Não se achando actualmente no Instituto os technicos que ultimamente se dedicaram ao estudo das anophelinas brasileiras, foi-me dada a incumbencia de examinar o assumpto, emittindo parecer sobre a determinação das especies mais importantes do genero *Cellia*.

Ao abordar a questão, encontrei-a encarada sob dois aspectos bem differentes.

De um lado, os especialistas brasileiros considerando principaes especies perfeitamente distinctas de *Anopheles* do grupo *Cellia*: *Anopheles argyritarsis*, *A. albimanus* e *A. tarsimaculatus*. De outro, um pesquizador norte americano, METCALF ROOT (38), distinguindo, em algumas dessas especies, outras não reconhecidas por aquelles pesquizadores e considerando algumas dellas não existentes em zonas em que têm sido assignaladas por aquelles especialistas.

Como nunca me occupara com a systematica dos culicideos, evidentemente não podia formar qualquer juizo sobre pareceres tão desencontrados sem examinar devidamente o material sujeito a controversia. Para isso procurei estudal-o adoptando a uma technica recommendavel em taes casos: retirar de cada fóco larvas bem desenvolvidas, isolal-as separadamente em vidros, montando a exuvia larval logo após a 1ª metamorphose e ulteriormente a exuvia pupal, após a emergencia das formas adultas; em seguida, proceder o exame comparativo dessas diversas formas evolutivas, conjunctamente com o das imagens obtidas nas criações e apanhadas em liberdade, estudando sobretudo a genitalia dos machos.

Baseado nas pesquizas até agora executadas, posso dizer que as verificações identicas feitas por METCALF ROOT são exactas. Vejo-me assim tentado a acreditar que as demais observações desse autor sejam tambem correctas e que o seu trabalho represente o *veredictum* na questão das especies do grupo *Cellia* (dos autores) ou, como elle as considera, do genero *Anopheles*, subgenero *Nyssorhynchus*.

Nas notas que se seguem estudarei apenas algumas dessas especies, occupando-me especialmente com as que eram tratadas pelos autores brasileiros, ora no genero *Cellia*, ora no genero *Anopheles*.

Seria dispensavel qualquer consideração sobre o nome generico dessas especies caso fossem correctamente designados em nosso meio. Entretanto, a julgar pela leitura de alguns trabalhos nacionaes, parece ainda prevalecer a opinião de serem as mesmas incluidas no genero *Cellia*, o que não mais se justifica, como passo a expôr.

THEOBALD (40), antes de descrever em sua monographia (1903) o genero *Cellia* como novo genero, apresentou, a 13 de Junho de 1902, uma classificação das anophelinas, na qual descreve os novos generos: *Grassia*, *Stethomyia*, *Howardia*, *Rossia*, *Laverania* e *Cellia*.

Desses generos, no momento, apenas nos interessam os dois ultimos. Para o genero *Laverania* (que differenciou de *Cellia* por apresentar as escamas abdominaes em tufos lateraes e em manchas dorsaes, emquanto que neste ultimo genero o abdomen, além dos tufos lateraes, é totalmente escamoso), apresenta como genotypo: *argyritarsis* ROB. DESV.

Para o genero *Cellia*, dá como genotypo: *pharoensis* THEOB.

Dias depois (a 28 de Julho) BLANCHARD, em communicação apresentada á Société de Biologie (1), propoz o nome *Nyssorhynchus*, em substituição a *Laverania* (THEOBALD (non GRASSI & FELLETI, 1890). Consequentemente: *argyritarsis*, especie typo de *Laverania* e não do genero *Cellia*, passou a ser designnada *Nyssorhynchus argyritarsis*. Quanto ao genero *Cellia*, só podia permanecer tal como foi creado, isto é, comprehendendo *pharoensis* THEOBALD, como genotypo e outras anophelinas que lhe são affins. Ora, sendo as especies deste ultimo grupo perfeitamente caracteristicas e bem distinctas das que constituem o genero *Nyssorhynchus*, exclusivamente neotropico, não se póde considerar como especies de *Cellia*: *argyritarsis*, *albimanus*, *tarsimaculatus* e outras congeneres. Aliás, o modo de vêr dos pesquizadores patricios era perfeitamente justificado, pois o proprio THEOBALD, em sua monographia, e os autores que o seguiram, juntaram especies typicas de *Nyssorhynchus* com as do genero *Cellia*, estabelecendo-se assim a confusão, que só poude ser esclarecida depois dos estudos recentes da systematica destes insectos, baseados sobretudo no exame da genitalia dos machos.

Como disse, os especialistas modernos consideram-nas hoje como especies do genero *Anopheles*, subgenero *Nyssorhynchus*, pois, na sua maioria, ou admittem na tribu Anophelini apenas o genero *Anopheles*, subdividido em varios subgeneros, ou dois generos: *Anopheles* e *Chagasia* (ROOT).

Todavia, a opinião que me parece mais acertada, respeito aos grupos genericos dessa tribu, é a de CHRISTOPHERS (9). Eis o que diz esse autor: "My personal bias is towards the recognition, as *genera*, of five distinct stems, *Chagasia*, *Bironella*, *Anopheles*, *Nyssorhynchus*, and *Myzomyia*. Each of these is precisely determinable by the male genitalia characters, so much so that no case recorded is there a single intermediate form known; nor is it easy to see how any of the known types could directly pass from one condition to another. These stems have a distinctive distribution such is seen for example in genera of mammals".

O autor citado ainda se extende em outras considerações que, a meu

ver, demonstram a necessidade de se elevar a categoria generica os grupos por elle ainda tratados em seu catalogo como subgeneros e talvez outros, como *Stethomyia*, ainda não devidamente estudados.

Eis porque, baseado na autoridade de CHRISTOPHERS, considerarei as especies que vou estudar, como pertencentes ao genero *Nyssorhynchus* e não ao genero *Anopheles*, subgenero *Nyssorhynchus*.

As especies de *Nyssorhynchus* podem ser distribuidas em 2 subgeneros: *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. O ultimo comprehende especies bem definidas, cujas larvas são bromelicolas. O primeiro abrange as especies de *Cellia* dos autores. Quanto ás especies do grupo *Myzorhynchella*, ainda não está definitivamente assentada a sua verdadeira posição systematica, pois se CHRISTOPHERS as incluio no subgenero *Nyssorhynchus*, fel-o tão sómente baseado em informação que lhe foi prestada por M. ROOT.

Realmente ROOT, em trabalho publicado em 1923 (36), diz que as especies de *Myzorhynchella* deviam pertencer ao subgenero *Nyssorhynchus*. Todavia, no anno seguinte (37), corrigindo esse trabalho, declarou ter ulteriormente verificado que o exemplar que lhe servio para fazer aquella affirmação não era a *Myzorhynchella lutzi*, como então julgara, e sim um verdadeiro *Nyssorhynchus*, talvez identico ao *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *brasiliensis*. Todavia, é provavel que o referido autor, com o abundante material que levou do Brasil, ainda elucide a questão, dizendo se *Myzorhynchella* deve constituir um grupo á parte, ficando assim o genero *Nyssorhynchus* com mais esse subgenero.

No subgenero *Nyssorhynchus* devem ser consideradas as seguintes especies:

Grupo *A*:

argyritarsis ROBINEAU-DESVOIDY, 1827.
albitarsis ARRIBALZAGA, 1878.
brasiliensis CHAGAS, 1907.
allopha LUTZ & PERYASSU', 1921.
rooti BRÈTHES, 1926.
darlingi ROOT, 1926.

Grupo *B*:

albimanus WIEDEMANN, 1821.
tarsimaculata GOELDI, 1905.
oswaldoi PERYASSU', 1922.
rondoni NEIVA & PINTO, 1922.
triannulata NEIVA & PINTO, 1922.
cuyabensis NEIVA & PINTO, 1923.
bachmanni PETROCCHI, 1925.
strodei ROOT, 1926.
evansi BRÈTHES, 1926.
davisi PATERSON & SHANNON, 1927.
perezi SHANNON & DEL PONTE, 1928.

Propositalmente separei-as em 2 grupos, o primeiro (grupo *A*) comprehendendo as especies que apresentam os 3 ultimos tarsaes do par pos-

terior totalmente brancos e o segundo (grupo *B*) abrangendo as que os apresentam tambem brancos, porém com um ou mais anneis negros.

Occupar-me-ei separadamente de cada um delles, estudando em primeiro lugar as especies de tarsos posteriores annelados. Neste ultimo grupo devem ser consideradas, primeiramente as especies que apresentam apenas um annel preto (I), isto é, *albimanus*, *tarsimaculata*, *oswaldoi*, *strodei*, *evansi*, *davisi* e *perezi*; em seguida, as de mais de um annel preto nos tarsos posteriores (II), isto é, *rondoni*, *triannulata*, *cuyabensis* e as formas duvidosas—*gorgasi* DYAR & KNAB e *tarsimaculatus*, raça do interior da Guyana Hollandeza, de BONNE.

Grupo *B* (Especies que apresentam os 3 ultimos articulos tarsaes brancos, porém com um ou mais anneis negros):

I. (Um annel preto apenas na base do ultimo tarso):

1. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *albimanus* (WIEDEMANN, 1821) (1).

E' possivel que se encontre esta especie no Brasil, porém, até agora, não foi assignalada por quem a tenha comparado com os topotypos.

Até bem pouco tempo acreditava-se que a unica differença entre *albimanus* e *tarsimaculatus* consistia na maior ou menor extensão das partes brancas dos palpos. Em *tarsimaculatus* os dois ultimos segmentos dos palpos são brancos, excepto nas basaes; em *albimanus*, são brancos o ultimo segmento e, do penultimo, apenas a articulação. Ora, no verdadeiro *albimanus*, como verificaram DYAR & KNAB e recentemente ROOT, a coloração dos palpos varia consideravelmente, encontrando-se especimens que certamente seriam considerados como pertencentes á especie *tarsimaculatus*.

Entretanto, como demonstrou ROOT, as duas especies devem ser perfeitamente distinctas. Examinando a genitalia dos machos de exemplares de *albimanus* da collecção do U. S. National Museum, apanhados no Panamá, e de outros colligidos em Porto Rico, e comparando-a com a de exemplares de *tarsimaculatus* procedentes do Brasil, esse pesquizador encontrou notavel differença nos lobulos dorsaes da pincetta (*claspette*), como se póde ver nas figuras de ROOT, que aqui apresento (fig. 1). Dahi elle acreditar que á informação mais correcta sobre a distribuição geographica desta especie seja a apresentada na monographia de HOWARD, DYAR e KNAB (1917, pp. 978 e 984).

Em um dos seus mais recentes trabalhos (38), o mesmo autor nos informa não ter obtido especimens de *albimanus* no Brasil e, baseando-se na verificação dos caracteres genitaes, dá a seguinte distribuição: Porto Rico, Haiti, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela e Colombia. Acha tambem provavel que esta especie se encontre na costa occidental da America Central e da America do Sul e em certas partes da America.

Carecem pois ser confirmadas todas as referencias feitas a *albimanus* no Brasil, pois é quasi certo que tenham sido consideradas pertencentes a esta especie, não só *tarsimaculatus*, como as especies *bachmanni* e *strodei*, esta ultima observada e descripta por M. ROOT e *bachmanni*, ainda não assignalada no Brasil, porém por mim encontrada em material colhido em Estrella (E. do Rio) e em outras partes do Brasil.

(1) A synonymia completa desta e das outras especies que vou estudar encontra-se no catalogo de CHRISTOPHERS ou no récente livro de DYAR—The mosquitoes of America, 1928.

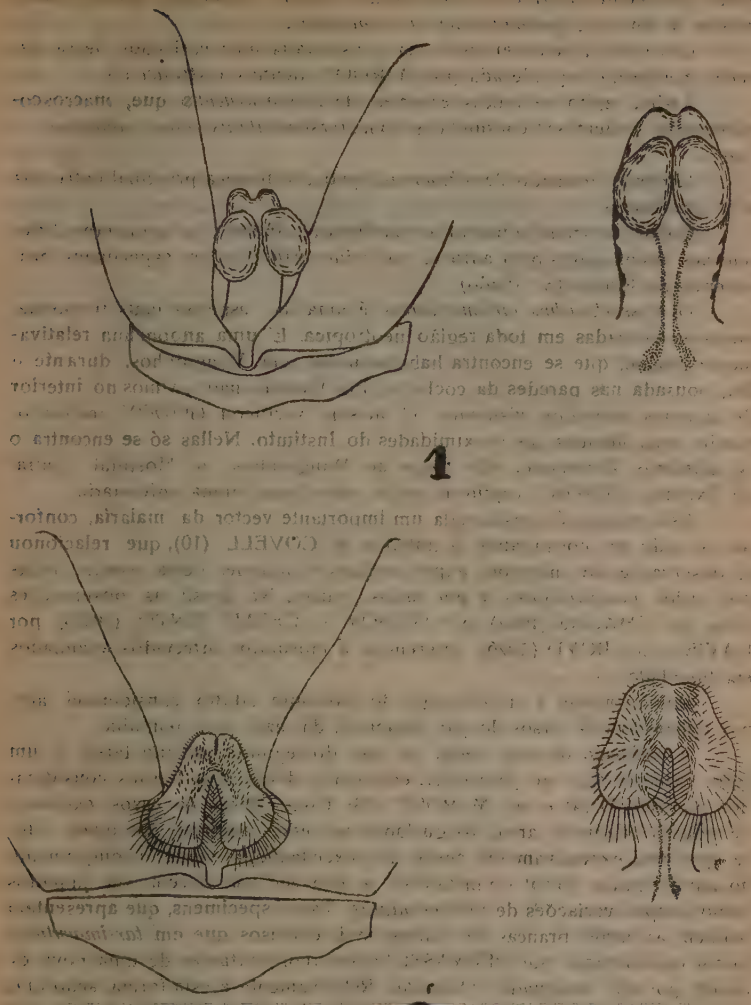


Fig. 1—Lobulos dorsaes reunidos da pincetta (claspette), aspecto dorsal (segundo ROOT).
1—de *Nyssorhynchus albimanus*,
2—de *Nyssorhynchus tarsimaculatus*.

2. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *tarsimaculatus* (GOELDI, 1905).

Num exame feito com lente de bolso só se póde confundir esta especie, na phase adulta, com a precedente e com o *Nyssorhynchus strodei*. O tamanho bem menor e o aspecto das azas, que se apresentam

quasi totalmente enegrecidas no bordo costal, facilmente differenciam, mesmo a olho nú, *bachmanni* de *tarsimaculatus*.

Oswaldoi, a meu ver, póde ser considerada uma variedade desta especie, e *evansi*, é considerada por M. ROOT identica a *strodei* (2).

Assim, repito, as unicas especies de *Nyssorhynchus* que, macroscopicamente, podem ser confundidas com *tarsimaculatus* são: *albimanus* e *strodei*.

Já vimos, tratando de *albimanus*, qual a differença principal entre ella e *tarsimaculatus*.

Quanto a *strodei*, quando a considerar, estudarei os caracteres differenciaes assignalados pelo autor e por mim verificados em especimens procedentes de Rincão (S. Paulo).

O *Nyssorhynchus tarsimaculatus* é uma das especies mais frequentemente encontradas em toda região neotropica. E' uma anophelina relativamente grande, que se encontra habitualmente em Manguinhos, durante o dia, pousada nas paredes da cocheira. Em Estrella não a vimos no interior de algumas casas que visitámos. O mesmo verificou GODOY inspeccionando casas situadas nas proximidades do Instituto. Nellas só se encontra o *N. albitarsis*. Entretanto, não longe de Manguinhos, no Hospital Central do Exercito, ARAGÃO capturou varios especimens numa enfermaria.

Esta especie é considerada um importante vector da malaria, conforme se póde ver consultando o trabalho de COVELL (10), que relacionou as observações de infecções experimentaes e naturaes desta especie, feitas por varios pesquizadores e em varios paizes. No Brasil as observações feitas por CHAGAS (1904), por GODOY e CESAR PINTO (1923), por DAVIS e por BOYD (1926), referem-se a mosquitos infectados apanhados em liberdade.

Relativamente á morphologia do mosquito adulto considerarei apenas o aspecto dos tarsos do par posterior, das azas e da genitalia.

A extensão da area negra na base do segundo articulo tarsal é um tanto variavel. Não me parece ser, entretanto, dentro dos limites considerados por BOYD (4) e por M. ROOT (38). Com effeito, os casos extremos de reducção daquella area, assignalados por esses autores, nos quaes ella se apresenta excessivamente curta, não excedendo, ás vezes, o comprimento do annel branco apical do metatarso, a meu ver, não devem ser julgados como simples variações de *tarsimaculatus*. Taes especimens, que apresentam tambem as partes brancas dos palpos mais extensos que em *tarsimaculatus* foram consideradas por PERYASSU' como representantes de uma nova especies, por elle designada—*Oswaldoi*. Relativamente a esta forma, acho que, a se admittir *strodei* como especie distincta de *tarsimaculatus*, o que me parece absolutamente certo, não é razoavel incluir *Oswaldoi* na synonymia desta ultima especie.

Nos exemplares de *tarsimaculatus* por mim examinados, do Districto Federal, dos Estados do Rio e de Minas Geraes, a referida area preta occupa pouco mais de um terço do segundo articulo tarsal, ás vezes, porém, abrange a metade do segmento e em muitos especimens occupa menos de 1/3. Excepcionalmente comprehende apenas o quarto basal.

(2) Quando estudar esta ultima especie tratarei da questão da identidade com *N. evansi*.

Nos especimens de *oswaldoi* que examinei, o annel preto, no maximo, occupa 15 o/o da extensão do articulo, apresentando-se, na maioria dos especimens, ou pouco mais extenso que o annel branco apical do metatarso (1º articulo tarsal), ou tão extenso ou mesmo menos extenso e, neste caso, mal se o destaca da côr branca do resto do articulo.

O aspecto das azas de *tarsimaculatus* é caracteristico e pouco variavel (fig. 9).

Quanto a genitalia desta especie, invariavelmente os lobulos dorsaes reunidos da pincetta são densamente pilosos desde o apice, como se póde ver nas figuras de M. ROOT e na microphotographia que apresento (fig. 10).

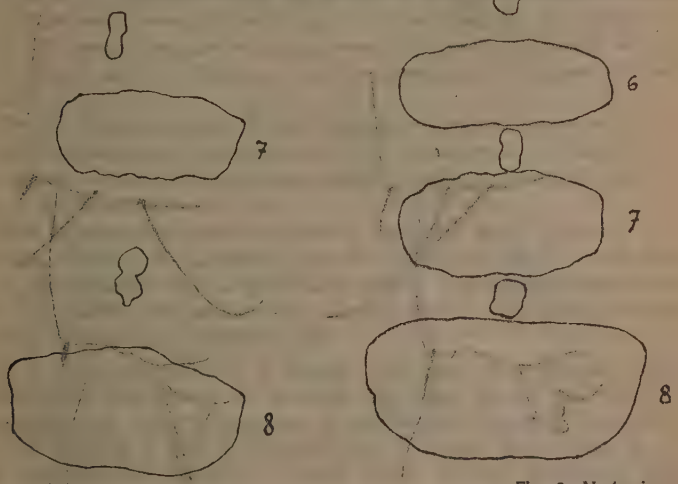


Fig. 2—*N. tarsimaculatus*. Placas dorsaes da larva.

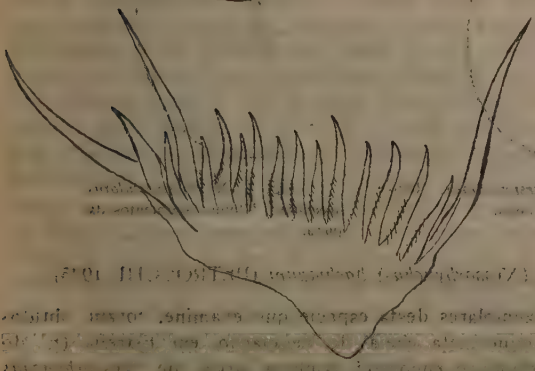


Fig. 3—*N. tarsimaculatus oswaldoi*. Placas e pecten da larva

Aliás o mesmo aspecto se observa nos exemplares de *oswaldoi*, de modo que, a não ser o aspecto dos tarsos do par posterior, não ha, nos mosquitos adultos, outra distincção caracteristica e constante entre *tarsimaculatus* e *oswaldoi*. Quasi que se póde dizer o mesmo com relação ás larvas das duas formas. As manchas negras tão evidentes na cabeça das larvas de *tarsimaculatus* não se vêm nas larvas de *oswaldoi* e a orla negra do bordo posterior da cabeça é nesta ultima forma mais estreita. Notam-se tambem pequenas differenças nas placas chitinosas abdominaes e nos pectens, aliás bem pouco caracteristicas (figs. 2 e 3), nada mais de importante se observando para differenciar as larvas. As pupas, entretanto, podem ser facilmente distinctas. Em *tarsimaculatus*, como, em geral, nas demais formas deste grupo, os espinhos inseridos nos angulos postero-lateraes dos ultimos segmentos abdominaes, são relativamente longos, emquanto que em *oswaldoi*, como verifiquei, são robustos, porém relativamente muito curtos (figs. 5 e 6). E' justamente este o principal caracter que me leva a manter *oswaldoi* com uma variedade de *tarsimaculatus*.

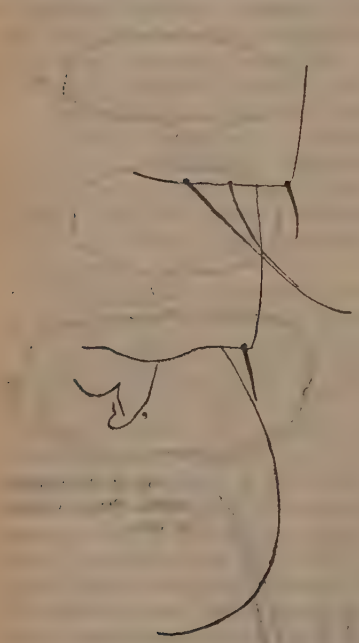


Fig. 5—*N. tarsimaculatus*. Ultimos segmentos da pupa.

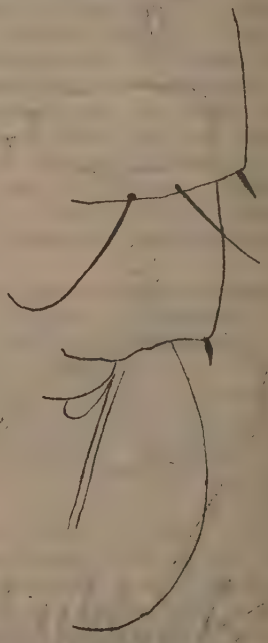


Fig. 6—*N. tarsimaculatus oswaldoi*. Ultimos segmentos da pupa.

3. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *bachmanni* (PETROCCHI, 1925).

Os primeiros exemplares desta especie que examinei foram obtidos de larvas apanhadas numa vala cheia de vegetação, em Estrella (E. do Rio). Nesse mesmo criadouro encontrei tambem larvas de *Nyssorhynchus*

albitarsis (ARRIBALZIGA), da variedade descripta por CHAGAS sob o nome de *Cellia brasiliensis*.

Examinando ulteriormente as anophelinas da collecção do Instituto Oswaldo Cruz, encontrei varios especimens de *bachmanni* colhidos em Campos (E. do Rio) e em Matto Grosso pelo Dr. CEZAR PINTO.

ROOT só examinou exemplares do Paraguay, apanhados pelo Dr. SOPER, e da Venezuela.

Parece, assim, que a distribuição geographica desta especie deve ser bem extensa, pois, alem da Argentina, do Paraguay e do Brasil, ella tambem foi encontrada na Venezuela e na Guyana Hollandeza. Incluo este ultimo territorio na área de distribuição porquanto a figura n. 82 apresentada por BONNE para a genitalia de *tarsimaculatus*, em seu manual sobre os mosquitos de Surinam, corresponde exactamente ao aspecto desse apparelho no *N. bachmanni*.

O mosquito adulto é facilmente reconhecivel. De facto é elle o unico *Nyssorhynchus* do subgenero *Nyssorhynchus*, de tamanho reduzido (pois, em geral, apresenta cerca de 3 a 4 mm. de comprimento, da cabeça ao apice do abdomen), que apresenta azas com as 2 grandes manchas negras no bordo costal quasi confluentes e os tarsos annellados como em *tarsimaculatus*.

Em *N. albimanus*, como já ficou dito anteriormente, as manchas da costa são bem separadas, como se pode vêr comparando a microphotographia da aza de um exemplar dessa especie colhido no Panamá, com a da aza de *bachmnni* (figs. 11 e 12).

O *N. cuyabensis* é talvez de todas as especies deste grupo a que mais se assemelha com *bachmanni*, não só no tamanho como no aspecto das azas, porem nessa especie, como assignalaram seus autores e como tive o ensejo de apreciar, ha mais de um annel preto na área branca apical dos tarsos, se bem que mal delimitado.

O *N. bachmanni*, embora de aspecto geral bem caracteristico, varia não sómente no porte como na extensão das áreas brancas das pernas. Nos exemplares de Matto Grosso, que se apresentam de exiguas dimensões (a aza tem cerca de 3 mm. de comprimento), a parte preta basal do 2º articulo tarsal do par posterior é maior que a branca, occupando esta pouco mais de 1/4 do articulo, attingindo, porem, ás vezes 1/3 do comprimento desse articulo. Nos articulos dos tarsos do par anterior as áreas brancas do 3º ao 4º articulo são relativamente reduzidas, em comparação com os especimens de Campos (E. do Rio). Assim, no 2º articulo, só o quarto apical é que é branco; no 3º e 4º a parte branca é approximadamente igual á parte preta basal. Nos exemplares de Campos, a parte preta basal do 2º articulo é pouco maior que a branca; no 3º e 4º articulos, a parte branca occupa quasi toda a extensão, ficando apenas uma annel preto basal. Nestes mesmos exemplares, que são tambem maiores que os de Matto Grosso (a aza tem 3,5 mm. de comprimento), nota-se um augmento da área branca apical do 2º articulo dos pares posteriores, a qual é bem mais extensa que a parte preta basal, occupando aquella 2/3 do articulo.

Aspecto identico ao destes ultimos especimens observa-se tambem nos exemplares de Estrella, que entretanto se apresentam muito pequenos (com azas de cerca de 2,5 mm.), e em alguns cotypos de *Anopheles davisi*,

que me foram gentilmente cedidos pelo Dr. DEL PONTE. Devo dizer que não só esta ultima especie, como a *Anopheles perezi*, foram recentemente incluidas por DYAR na synonymia de *N. bachmanni*.

A genitalia do macho de *bachmanni* é caracteristica. Foi bem descripta e figurada por PETROCCHI e novamente estudada por M. ROOT, que frisou a importancia taxionomica do aspecto dos lobulos dorsaes fundidos da pincetta, prolongados no apice em 2 appendices chitinosos, triangulares ou em forma de orelha, como se pode ver nas microphotograpias das genitalias que aqui apresento (figs. 13 e 14). Uma foi retirada de um exemplar de Campos e a outra de um especimen de Matto Grosso. O microphotographo focalisou apenas os lobulos dorsaes fundidos da pincetta, para melhor se vêr o aspecto dos appendices ha pouco referios. Pode-se tambem verificar que esses orgãos são totalmente desprovidos de pêlos.

As larvas de *N. bachmanni* são tambem caracteristicas. Apresentam-se, em geral, pretas com 3 manchas brancas, uma maior no thorax, uma no 2º e outra no 5º segmentos abdominaes. Taes manchas são melhor delineadas nas larvas mais jovens, que nas do ultimo estadio. A cabeça é em grande parte negra, notando-se apenas duas áreas mais claras lateraes para traz da inserção das antennas.

As cerdas clypeaes anteriores e internas são um tanto approximadas. O espaço entre ellas é approximadamente igual a metade da distancia entre cada uma e a cerda clypeal antero-externa correspondente.

No grupo de cerdas thoraxicas anterior e submediano ha, de cada lado, uma cerda palmada com 17 folíolos.

Para o lado do abdomen o caracter mais importante é a differença notavel entre as duas placas chitinosa dorsaes do 8º e do 7º segmentos. Sob este ponto de vista a larva de *bachmanni* assemelha-se muito á de *darlingi*, porem nesta ultima especie, não só as cerdas internas do grupo thoraxico anterior e submediano não são palmadas e sim de ramificações filamentosas, como ha, em cada um dos labios posteriores do apparelho opercular dos estigmas, uma grande cerda, que não se encontra em *bachmanni*, como se póde verificar na figura 15.

As pupas de *bachmanni* nada de extraordinario apresentam. As tubas respiratorias são do typo observado nas demais especies de *Nyssorhynchus*.

Quanto ao papel do *N. bachmanni* na epidemiologia da malaria, DYAR em seu recente trabalho sobre os mosquitos da America (14), diz que é, sem duvida, um perigoso transmissor dessa doença. Entretanto, que me conste, ainda não foram publicadas observações nesse sentido. Todavia, como mais cedo ou mais tarde se estudará esse papel, convem assignalar que, sendo uma anophelina muito pequena, pode facilmente atravessar as télas habitualmente usadas na protecção contra os mosquitos.

4. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *strodei* (ROOT, 1926).

Os unicos exemplares que obtive desta especie foram criados de larvas colhidas pelo Dr. LAURO TRAVASSOS em Rincão, Pinheiro e Guarulhos (São Paulo).

Não ha, como pondera o proprio autor da especie, um caracter externo, absolutamente infallivel, pelo qual se possa distinguir facilmente

esta especie de *N. tarsimaculatus*. E' tambem difficil differençal-a, pelos caracteres geraes, de *N. albimanus*. Entretanto, collocando um exemplar de *strodei* ao lado de um de *tarsimaculatus*, evidenciam-se as differenças, pequenas embora, mas sufficientes para se vêr que se trata de um outro typo de mosquito. De facto, o *N. strodei* é de menor porte que o *N. tarsimaculatus*. Emquanto que nesta ultima especie as escamas claras do corpo são de cor amarella, naquella só ha escamas amarellas no abdomen e nas pernas; as escamas claras das azas, do mesonotum e do scutellum são de um branco de neve. As azas (fig. 16) e os palpos apresentam tambem algumas differenças em relação com o *N. tarsimaculatus*. O que entretanto caracterisa o *N. strodei* é o aspecto inconfundivel dos lobulos dorsaes da pincetta, na genitalia do macho, como se pode observar na figura 17.

As larvas de *N. strodei*, como demonstrou M. ROOT, são muito semelhantes ás de *N. tarsimaculatus*; nestas, porem, as cerdas clypeaes medianas não são muito approximadas, como em *strodei*. De facto, o espaço entre ellas em *strodei* é, como verifiquei, igual á quarta parte da distancia entre cada uma e a cerda clypeal lateral correspondente, ao passo que em *tarsimaculatus* esse espaço é pouco mais largo que a metade da referida distancia. Ademais, nas larvas de *tarsimaculatus*, os tufos palmados do grupo thoraxico antero-mediano apresentam um menor numero de foliolos (de 10 a 14) e estes são de cor cinzenta uniforme com a extremidade, *embora afilada, como que cortada ou aparada*.

Nas larvas de *strodei* as referidas cerdas apresentam uma maior numero de foliolos (cerca de 18), *de apice muito afilado* (fig. 7). Aliás

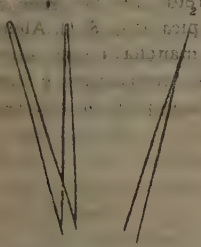


Fig. 7—Aspectos dos foliolo dos tufos palmados do abdomen em:
1—*N. tarsimaculatus* e outras especies de *Nyssorhynchus*.
2—*N. strodei*.

este ultimo aspecto, que é constante e me parece bem caracteristico, tambem se observa nos demais tufos palmados do thorax e do abdomen.

Não sei como se apresentam os foliolos dessas cerdas palmadas em *albimanus*, porem em *argyritarsis*, em *albitarsis*, em *darlingi*, em *tarsimaculatus* e em *bachmanni* são tambem cortados na ponta, como em *tarsimaculatus*.

As pupas de *strodei* são praticamente indistinguiveis das de *albimanus* e *tarsimaculatus*.

ROOT, em trabalho publicado recentemente (39) sobre o genero *Chagasia*, referindo-se ao *Nyssorhynchus* que anteriormente descrevera sob o nome de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *strodei*, considera-o synonymo de *evansi* BRÈTHES. Tambem assim o considera DYAR no seu ultimo trabalho sobre os mosquitos americanos. Nestas condições, ao estudar essa especie, deveria tel-a tratado sob o nome de *Nyssorhynchus evansi* (BRÈTHES) e

não como *N. strodei* (ROOT). A razão dessa discordancia é que não estou convencido de que os dois nomes se refiram a uma unica especie.

De facto, a figura que BRÈTHES apresentou para a genitalia de *Cellia evansi* não corresponde nem a descripção, nem ao aspecto do hypopygium de *N. strodei*. Alem disso, segundo me informou o Dr. DAVIS, os mosquitos que elle cedeu a BRÈTHES e com os quaes este ultimo especialista fundamentou a diagnose especifica de *evansi*, eram todos especimens de *tarsimaculatus*. Aliás DAVIS narrou tambem o mesmo facto a DYAR, que o cita em seu ultimo trabalho (1928). Eu mesmo tive o ensejo de observar aspecto semelhante ao do desenho da genitalia da *Cellia evansi*, comprimindo a genitalia de um macho de *bachmanni*.

Assim, ao meu ver, a *Cellia evansi* ainda é muito duvidosa, e emquanto não se examinar o typo ou os co-typos de BRÈTHES, não se pode concluir, com absoluta segurança, pela identidade de *strodei* com *evansi*.

Dahi ainda aqui considerar o *N. strodei* do Brasil como uma boa especie, distincta de *Cellia evansi*, sendo esta ultima talvez identica a *tarsimaculatus*.

II. (Mais de um annel preto na área branca dos tarsos posteriores).

1. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *rondoni* (NEIVA e PINTO, 1922).

Os exemplares desta especie, por mim examinados e gentilmente cedidos ao Instituto Oswaldo Cruz pelo Dr. DEL PONTE, foram todos apanhados na Republica Argentina pelo Dr. SHANNON.

Trata-se de uma especie bem differente das demais deste grupo. Caracterisa-a sobretudo o aspecto da área branca dos tarsos do par posterior. A referida área apresenta dois anneis pretos, um na base do 3º articulo tarsal e outro na base do articulo apical (fig. 8, 1). Além disso ha, no mesonotum de *N. rondoni*, uma grande mancha negra que abrange uma área semi-circular da porção posterior do mesoscutum e cerca dos 2 quartos medianos do scutellum. A microphotographia n. 18, representa a aza desta especie.

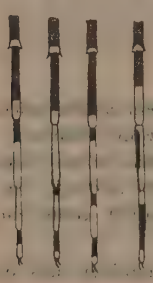


Fig. 8—Aspecto schematico dos tarsos posteriores em :
1—*N. rondoni*.
2—*N. cayabensis*.
3—*N. triannulatus*.
4—*N. gorgasi*.

Ainda não foi descripto ou figurado o aspecto da genitalia do macho de *N. rondoni* e nada se sabe relativamente ás larvas e pupas desta especie. Pesquizas realisados recentemente por DAVIS e SHANNON (13) mostram que esta especie, embora vista em quantidade apreciavel no interior das habitações, não foi encontrada infectada. Falharam tambem as tentativas feitas por esses pesquizadores para obter experimentalmente mosquitos infectados.

2. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *cuyabensis* (NEIVA e PINTO, 1923).

Só ha actualmente na collecção do Instituto Oswaldo Cruz um unico exemplar desta especie, aliás em máo estado de conservação. Pode-se, entretanto, ainda verificar que se trata de um mosquito extremamente semelhante ao *N. bachmanni*. Como elle, é uma especie de pequeno porte, com as azas quasi totalmente negras no bordo costal (fig. 16). Não fosse o aspecto da área branca dos tarsos posteriores e não haveria outra differença para distinguil-a do *N. bachmanni*.

Como em *N. rondoni*, ha em *cuyabensis* 2 anneis naquella área, porem o annel proximal não se acha no 3º articulo, que é todo branco, e sim na base do 4º (fig. 8, 2).

Tambem nada se sabe relativamente á ethologia desta especie. O mesmo posso dizer em referencia ao *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *triannulatus* (NEIVA e PINTO, 1922), descripto de uma unica femea apanhada em Matto Grosso.

Esta especie, segundo os autores, distingue-se de todas as outras deste grupo, por apresentar, na área branca apical, 3 anneis negros na base de cada um dos 3 ultimos articulos dos tarsos posteriores (fig. 8, 3).

Como não conheço o mosquito, pois o typo não se encontra actualmente na collecção do Instituto Oswaldo Cruz, deixo de sobre elle me manifestar.

Ao terminar esta parte, em que estudo sómente as especies que apresentam a área branca apical dos tarsos posteriores com 1 ou mais anneis, não posso deixar de dizer algumas palavras sobre a raça de *tarsimaculatus* do interior da Guyana Hollandeza, estudada por BONNE (2) e sobre *Anopheles gorgasi*, de DYAR e KNAB.

A primeira deve ser a variedade *oswaldoi* do *N. tarsimaculatus*, já anteriormente estudada. As observações interessantes de BONNE relativamente as habitos dessa raça no interior da Guyana Hollandeza, reforçam, até certo ponto, as differenças morphologicas assignaladas por PERYASSU', quando descreveu essa variedade como uma nova especie.

Quanto á especie *gorgasi*, penso que, acceitando-se o *N. triannulatus* como especie distincta, não ha razão para não se admittir aquella como boa especie, pois exactamente o que a caracterisa é o aspecto dos tarsos posteriores, completamente differente do que se observa nas demais especies de *Nyssorhynchus*, como se pode ver na figura schematica que aqui apresento, copiada do trabalho de BONNE (2), que a desenhou segundo a descripção de DYAR e KNAB (fig. 8, 4).

Grupo *A*. (Especies que apresentam os 3 ultimos articulos tarsaes do par posterior brancos).

Deste grupo, como mostrei anteriormente, foram descriptas as seguintes especies:

argyritarsis ROBINEAU-DESVOIDY, 1827.
albitarsis ARRIBALZAGA, 1878.
brasiliensis CHAGAS, 1907.
allopha LUTZ & PERYASSU', 1921.
rooti BRÈTHES, 1926.
darlingi ROOT, 1926.

De todas ellas apenas 3 podem permanecer como verdadeiras especies: *argyritarsis*, *albitarsis* e *darlingi*.

Com effeito, os caracteres de *Cellia allopha* LUTZ & PERYASSU' são exactamente identicos aos que se encontram nas descripções do verdadeiro *Nyssorhynchus argyritarsis* (ROB.—DESV.). Como se sabe, a ausencia de tufos de escamas erectas nos angulos lateraes posteriores dos segmentos abdominaes foi o caracter frisado, pela maioria dos nossos especialistas, para distinguir a forma *allopha* de *argyritarsis*. Ora, a anophelina deste grupo que sempre apresenta taes tufos é o *Nyssorhynchus albitarsis*, considerada em nosso meio ou como *Cellia argyritarsis* ou como *Celtia brasiliensis*. Assim sendo, era natural que os especimens do verdadeiro *N. argyritarsis* fossem julgados uma nova especie, a qual foi denominada *Cellia allopha*.

De facto, todos os exemplares de *N. argyritarsis* que tenho examinado (de Manguinhos, de Angra dos Reis (E. do Rio), de Minas Geraes e da R. Argentina), apresentam algumas escamas negras nos angulos postero-lateraes do abdomen, porem estas não constituem tufos tão evidentes como em *N. albitarsis*. Resta, entretanto, saber se ha realmente exemplares de *N. argyritarsis* providos desses tufos. Eu ainda não os vi; todavia, mesmo que se os encontre, se fôr essa a unica differença que os distinga da forma *allopha*, não haverá razão para se considerar esta ultima nem mesmo como variedade distincta de *argyritarsis*.

Relativamente a especie descripta por BRÈTHES com o nome de *C. rooti* unicamente pelo aspecto da genitalia do macho, é possivel que se trate da mesma que foi ulteriormente descripta por M. ROOT sob o nome de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, e, neste caso, aquelle nome prevalecerá por ter prioridade e a especie será mantida, pois o aspecto da genitalia e sobretudo da larva em *darlingi* é bem differente do que se observa em *N. argyritarsis* e em *N. albitarsis*. Tudo porem leva a acreditar que *C. rooti* seja mais um nome a acrescentar na synonymia de *N. argyritarsis*.

Quanto a *Cellia brasiliensis*, é, como demonstrou ROOT (1926) uma simples variedade de *Cellia albitarsis*.

Consequentemente, terei de estudar, neste grupo, apenas o *N. argyritarsis*, o *N. albitarsis*, com a variedade *brasiliensis* e o *N. darlingi*.

1. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *argyritarsis* (ROBINEAU-DESVOIDY, 1827).

Distinguem-se facilmente as femeas desta especie das de *N. albitarsis* pelos caracteres que se seguem. Palpos, visto de cima, negros em quasi toda a extensão; apenas ha escamas brancas revestindo todo o segmento apical e formando dois anneis, um mais largo ao nivel da articulação do penultimo segmento com o antepenultimo e outro ao nivel da articulação deste com o precedente. As escamas claras das azas são, em geral, de um branco de neve, principalmente para o lado da costa. Embora haja escamas negras nos angulos postero-lateraes do abdomen, estas não formam tufos erectos, como em *albitarsis*. Os 2 ultimos segmentos abdominaes da femea não são revestidos dorsalmente de escamas brancas. Os tarsos medios quasi sempre se apresentam sem anneis brancos no apice do 1º, do 2º e do 3º articulos. Os posteriores não apresentam annel branco no apice do 1º arti-

culo e a parte negra basal do 2º occupa 1/4 ou 1/3 da extensão do articulo. Raramente é mais extensa, e quando isso se observa, não ha annel branco apical no 1º articulo.

Quanto aos machos, é muito facil differenciar as duas especies em questão pelo exame da genitalia. Em *argyritarsis* o mesosoma apresenta um par de foliolos recurvados e bem chitinisados, os quaes, nas preparações em que se comprime a genitalia, se apresentam denteados (fig. 21).

Tambem as larvas de *argyritarsis* são bem differentes das de *albitarsis*. Nellas as cerdas clypeaes medianas são entre si approximadas e bem afastadas das lateraes. O espaço entre uma das medianas e a lateral correspondente é cerca de 5 vezes o que fica entre as medianas. As antennas geralmente são claras na base e escuras do meio para o apice. Só ha 6 pares de tufos palmados entre as placas dorsaes do abdomen. Nos pontos do thorax em que, em *albitarsis*, se implantam os tufos palmados, encontram-se cerdas de ramificações filamentosas, observando-se o mesmo no espaço entre a 1ª e a 2ª placa dorsal do abdomen. As pupas de *argyritarsis* são muito semelhantes as de *albitarsis*, sendo bem difficil distinguil-as.

Quanto ao papel do *N. argyritarsis* na transmissão da malaria comparado com o do *N. albitarsis*, parece ser de importancia secundaria. De facto, todas as observações publicadas em nosso meio dando o *N. argyritarsis* como naturalmente infectado, mui provavelmente se referem ao *N. albitarsis*. Por outro lado as pesquizas feitas em nosso paiz com a *Celia allopha*, que deve ser o *N. argyritarsis* typico, não revelaram até hoje a existencia de exemplares infectados.

2. *Nyssorhynchus* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (ARRIBALZAGA, 1878).

Quem examina um exemplar desta especie não pode deixar de se impressionar com a grande semelhança que ella offerece com o *N. tarsimaculatus*. De facto, apresenta quasi todas os caracteres desta ultima especie, excepto o annel negro no articulo apical dos tarsos posteriores. E a semelhança das 2 formas ainda mais se accentua nas larvas e nas pupas, que, na pratica, difficilmente podem ser differenciadas. Os palpos, em geral, apresentam-se como em *N. tarsimaculatus*. As escamas claras das azas são amarelladas. Os tufos de escamas negras nos angulos postero-lateraes do abdomen são tambem salientes. O ultimo segmento do abdomen é revestido dorsalmente de escamas amarelladas entremeiadas de escamas brancas, que, ás vezes, são mais abundantes que as amarellas. Os tarsos medios apresentam o 1º, o 2º, o 3º, e ás vezes o 4º e o 5º distinctamente annelados de branco no apice. Os posteriores apresentam um annel branco no apice do 1º articulo e a parte negra basal do 2º, embora extraordinariamente variavel, nunca se encontra tão pequena como em *argyritarsis*. Realmente, nesta ultima especie, é raro ver-se a mancha negra attingir ou exceder o meio do segmento; frequentemente occupa o quarto, ou, no maximo, o terço basal do articulo, emquanto que em *albitarsis* ella é igual ou maior que a parte branca apical. Assim, em exemplares da baixada do Districto Federal e do Estado do Rio, a parte preta occupa mais de metade do articulo. Em exemplares de Minas Geraes ella é um pouco mais extensa (cerca de 66 o/o do articulo). Em uma serie de exemplares de Matto Grosso

é ainda maior, abrangendo de 70 a 78 o/o do articulo. Finalmente, em alguns especimens de Pinheiro e de Guarulhos (S. Paulo), occupa quasi todo o segmento (de 85 a 89 o/o). E' interessante notar que alguns destes ultimos exemplares apresentam muitas escamas brancas do dorso do ultimo e do penultimo uromeros (v. aza de um destes exemplares, fig. 23).

Os machos de *albitarsis* tambem se parecem com os de *tarsimaculatus*, porem, como as femeas, não apresentam annel preto no articulo apical dos tarsos posteriores. Distinguem-se dos de *argyritarsis*, não sómente pelos caracteres já referidos a proposito da femea, como pelo aspecto do mesosoma da genitalia. Em *albitarsis*, alem desse orgão sêrpouco chitinisado no apice, não apresenta os 2 foliolos caracteristicos, tão bem estudados por EDWARDS (1920), EVANS (1921) e ROOT (1926).

As larvas de *N. albitarsis*, como disse, são muito semelhantes ás de *N. tarsimaculatus*, e é mesmo praticamente impossivel apresentar um caracter infalivel para o reconhecimento das 2 especies. Todos os caracteres que foram assignalados por M. ROOT para distincção das duas especies de larvas são sujeitos a variações individuaes, que nos podem levar facilmente á confundil-as.

Essa confusão, entretanto, não se pode dar com as larvas de *argyritarsis*, pois em *albitarsis*, como em *tarsimaculatus*, ha tufos palmados no grupo de cerdas thoraxicas anteriores e entre a 1ª e a 2ª placa dorsal do abdomen, semelhantes aos demais do abdomen. Alem disso, em *albitarsis*, o espaço entre as cerdas clypeaes médias é igual ou quasi igual ao que fica entre uma dessas cerdas e a cerda lateral correspondente.

Pelo que tenho lido e pelas informações que pude colher até agora, tenho a impressão de que o *N. albitarsis*, no Brasil, é a anophelina mais importante sob o ponto de vista da epidemiologia da malaria. E' ella que se encontra habitualmente no interior das habitações, nas zonas assoladas por aquella doença, e todas as referencias feitas a mosquitos da especie *argyritarsis*, natural ou experimentalmente infectados, pelas razões já expendidas, devem ser applicadas ao *N. albitarsis*.

Antes de concluir o que posso dizer relativamente a esta especie devo ainda considerar a forma descripta por CHAGAS sob o nome de *Cellia brasiliensis*.

ROOT estudou-a perfeitamente e, por isso, transcrevo para aqui o que elle disse em seu admiravel trabalho sobre as nossas anophelinas (1926).

"A femea adulta differe definidamente, embora por pequenos caracteres, de qualquer das outras especies brasileiras por mim estudadas, approximando-se mais de *argyritarsis* que de *albitarsis*. A genitalia do macho parece ser identica a do macho de *albitarsis* e as larvas de *brasiliensis* e de *albitarsis* são tambem praticamente identicas. Nesse caso, retenho o nome dado pelo Dr. CHAGAS como o de uma variedade, classificando-a, porem, sob a especie *albitarsis*.

Differe esta variedade evidentemente de *albitarsis* typica por occupar a area negra do 2º articulo de tarsos posteriores menos de metade dos articulos e pela ausencia do annel branco na extremidade do 1º articulo tarsal. Por estes caracteres ella se assemelha a *argyritarsis*. Differe, porem desta ultima especie, não sómente pelos tres caracteres assignalados pelo

Dr. CHAGAS na sua descripção original (tamanho menor, os dois ultimos segmentos abdominaes da femea dorsalmente revestidos de escamas brancas e a distribuição relativamente esparsa das escamas cremes nos demais segmentos abdominaes), como tambem pelo que se segue. Em *brasiliensis* os articulos dos tarsos medianos geralmente apresentam pelo menos 2 aneis brancos, ordinariamente ausentes em *argyritarsis*. Na aza de *brasiliensis* a mancha branca costal ao nivel da nervura transverso-humeral é approximadamente de igual extensão a da mancha preta precedente (a área branca é evidentemente mais larga em *argyritarsis*). O apice do ramo inferior da 2ª nervura, a forquilha da 4ª e a maior parte do tronco da 4ª são geralmente revestidos de escamas brancas em *argyritarsis* e de escamas negras em *brasiliensis*".

Examinei varios mosquitos da especie *N. albitarsis*, obtidos de larvas colhidas em Estrella e em Manguinhos, os quaes devem ser considerados como pertencentes á variedade *brasiliensis*, pois a femea apresenta os caracteres assignalados por CHAGAS.

Desses caracteres o que parece mais importante é o que se refere ás escamas nos dois ultimos segmentos abdominaes. Ao obter, de larvas do mesmo fóco e exactamente semelhantes, mosquitos com os caracteres de *brasiliensis*, verifiquei que se a maioria dos exemplares apresenta esses segmentos inteiramente revestidos de escamas brancas, ha outros em que estas só revestem o ultimo, sendo o penultimo coberto de escamas amarelladas. E em taes especimens tambem se observa um annel apical branco, embora muito estreito, no apice do 1º articulo dos tarsos posteriores e a parte negra do 2º articulo tarsal occupa, em geral, a metade do articulo.

Em exemplares de Campos, cujos machos apresentam os 2 ultimos segmentos abdominaes revestidos de escamas brancas, as femeas apresentam ou esses segmentos inteiramente revestidos de escamas amarelladas, ou somente o ultimo com escamas brancas, ou tambem o penultimo com algumas escamas brancas. Nesses exemplares, em geral, a parte negra basal do 2º articulo dos tarsos posteriores é um pouco menos extensa que a branca, porem ha muitos em que as duas partes são de igual extensão, havendo tambem alguns especimens em que a parte branca é pouco menos comprida que a negra. E todos esses exemplares foram apanhados no mesmo local e na mesma occasião. Apresentam tambem um annel branco no apice do 1º articulo dos tarsos posteriores. Todos, entretanto, tem o aspecto geral de *N. albitarsis* typico e, sob este ponto de vista, differem um pouco dos exemplares de Estrella. DAVIS, ultimamente (12), teve tambem o ensejo de observar exemplares typicos de *albitarsis* com os dois ultimos segmentos abdominaes sómente revestidos de escamas brancas.

Os machos de *brasiliensis* são muito semelhantes aos de *albitarsis*, principalmente no aspecto da genitalia.

Pelo exposto, ve-se que ROOT, mantendo *brasiliensis* como uma variedade perfeitamente distincta de *albitarsis* typica, frisou caracteres que, na pratica, nem sempre se observam como elle os descreveu.

Quanto ás larvas de *brasiliensis* o unico caracter que me parece mais constante para distinguir *brasiliensis* de *albitarsis*, aliás tambem referido por M. ROOT, é o alongamento das cerdas clypeas medianas, que se apresentam bem mais compridas que as lateraes. Todavia SHANNON e DA-

VIS (12) observaram muitas larvas, com cerdas clypeaes medianas alongadas, que, entretanto, deram mosquitos do verdadeiro typo *albitarsis*.

Assim, embora adoptando a opinião de ROOT relativamente a *brasiliensis*, pois só elle examinou especimens desta variedade colhidos no local em que foram apanhados os cotypos, penso que a questão de se a considerar como uma variedade ou como simples variação de *albitarsis*, ainda não se acha definitivamente resolvida.

Em favor da separação de *brasiliensis* como variedade distincta de *albitarsis* fallam as observações de CHAGAS, NEIVA, GODOY e C. PINTO e ROOT relativas ao comportamento desta especie. Todos esses autores são accórdes em affirmar que *brasiliensis* é uma anophelina que pica de dia, mesmo em plena luz solar.

Nyssorhynchus (*Nyssorhynchus*) *darlingi* (ROOT, 1926).

Ainda não tive o ensejo de vêr o mosquito adulto desta especie, segundo ROOT, muito semelhante ao *N. albitarsis*. Apenas em *darlingi* a extremidade do abdomen apresenta menos escamas brancas que em *albitarsis* e a parte négra basal do 2º articulo dos tarsos posteriores, em geral, occupa menos da metade do articulo, abrangendo, em casos extremos, 49 o/o do comprimento desse articulo. Todavia, se ha essa grande semelhança das femeas de *darlingi* com as de *albitarsis*, os machos são bem differentes pelo aspecto da genitalia. De facto, em *darlingi* o mesosoma apresenta um par de foliolos semelhantes aos que se encontram em *argyritarsis*. A proposito da genitalia de *darlingi*, diz ROOT o seguinte:

"The mesosome is longer and more slender than in the other two species (*albitarsis* e *argyritarsis*) and the tip is even more heavily chitinized than in *argyritarsis*. The ventral lip is more prolonged than in the other species. A pair of long, straight leflets are present and seem to be attached near instead of at their base, so that there is a short, blunt-ended portion extending cephalad. The leaflets are not obviously serrate. The dorsal lobes of the claspette are low, not as long as the mesosome, and have a truncate apex. In some preparations their truncate portion appears to bear sparse, short hairs".

A larva de *darlingi* é, como bem diz ROOT, unica entre todas as larvas de anophelinas. De facto, nenhuma apresenta as duas cerdas robustas, emergindo de tuberculos salientes situados nos labios posteriores do apparelho opercular dos estigmas. Tal disposição póde ser bem apreciada na microphotographia (fig. 25,) de parte do tegumento de uma larva de *N. darlingi* que encontrei morta num vaso em que criava larvas de *N. argyritarsis*, colhidas em Angra dos Reis (Estado do Rio) pelo Dr. L. TRAVASSOS.

Embora a larva de *darlingi* se assemelhe á de *albitarsis* pelo aspecto geral do corpo, não apresenta, como esta, tufos palmados no grupo submediano e anterior de cerdas thoraxicas. No lugar dos tufos ha cerdas identicas ás que se encontram em *argyritarsis*, isto é, divididas em ramificações filamentosas.

Tambem em *darlingi* a 8ª placa dorsal do abdomen é muito maior que a 7ª, como se pode tambem apreciar na microphotographia. Por esta ultima disposição ella se assemelha á larva de *N. bachmanni*. Tambem a côr da cabeça e das antennas, até certo ponto, a fazem semelhante á lar-

va de *bachmanni*. Como em *bachmanni* a cabeça é negra, excepto ao nivel das áreas occulares, que são incolores, e as antennas são mais enegrecidas na metade apical.

As pupas de *darlingi*, como mostrou ROOT, são tambem differentes das demais pupas deste grupo, não só pela forma das tubas respiratorias, como pelo aspecto dos espinhos postero-lateraes dos ultimos segmentos abdominaes, que são muito curtos e robustos, como em *N. tarsimaculatus oswaldoi*. Nesta variedade, porem, as tubas respiratorias são do typo normalmente observado nas demais pupas de *Nyssorhynchus*.

ROOT encontrou esta especie no Districto Federal e na baixada do Estado do Rio. Em Porto das Caixas capturou, no interior das habitações, *albitarsis* e *darlingi*, em igual quantidade. Em Sant'Anna, porem, encontrou-a dentro das casas em maior quantidade que *albitarsis*.

Nada se sabe, porem, relativamente á possibilidade de transmittir a malaria.

CHRISTOPHERS, em seu catalogo, já caracterisou perfeitamente o genero *Nyssorhynchus*, subgenero *Nyssorhynchus*. Aliás as especies que o constituem são, como vimos, as que eram incluidas no genero *Cellia* na maioria dos trabalhos brasileiros de systematica das anophelinas.

Por isso, ao concluir este trabalho, deixo de lado a caracterisação do grupo *Nyssorhynchus* e apresento tão somente as chaves para a determinação das especies que o constituem, orientando-me principalmente nas que foram apresentadas por CHRISTOPHERS e ROOT.

1	Femeas	2
1a	Machos	13
2 (1)	Ultimo articulo dos tarsos posteriores (5^s) com annel negro basal	3
2a	Ultimo articulo dos tarsos posteriores todo branco	10
3 (2)	Penultimo articulo (4^o) com annel negro basal	4
3a	Penultimo articulo (4^o) todo branco	5
4 (3)	Antepenultimo articulo (3^o) com um annel negro basal,	*triannalatus*
4a	Antepenultimo articulo (3^o) todo branco	*cuyabensis*
5(3a)	Antepenultimo articulo (3^o) com um largo annel preto basal; uma grande mancha escura abrangendo a parte mediana posterior do mesonotum e todo o meio do scutellum	*rondoni*
5a	Antepenultimo articulo (3^o) todo branco, mancha posterior do mesonotum pequena	6
6 (5a)	Especie pequena, com as 2 grandes manchas negras da costa quasi confluentes	*bachmanni*
6a	Especies grandes ou pequenas, porem com as 2 grandes manchas negras da costa bem separadas	7
7 (6a)	Parte negra basal do 2^o articulo dos tarsos posteriores tão extensa ou pouco mais extensa que o annel branco apical do 1^o articulo	*tarsimaculatus oswaldoi*
7a	Parte negra basal do 2^o articulo dos tarsos posteriores, no minimo, occupando um quarto do comprimento do articulo, porem, em geral muito mais extensa	8

8 (7a) Palpos com os 2 ultimos articulos brancos ou revestidos de escamas de côr crême, excepto num estreito annel nas bases; especie de grande porte..... *tarsimaculatus*

8a Palpos com o ultimo articulo e apenas as articulações dos 2 precedentes com escamas brancas; especies de menor porte..... 9

9 (8a) Escamas claras do thorax e das azas principalmente perto da costa de um branco de neve..... *strodei*

9a Escamas claras do thorax e das azas de uma côr crême ou amarella..... *albimanus*

10 (2a) Tarsos medios, em geral, sem anneis brancos apicaes; 1º articulo dos tarsos posteriores sem annel branco apical; 2º articulo com a area negra, em geral, muito menos extensa que a area branca..... *argyritarsis*

10a Tarsos medios annelados de branco no apice, pelo menos nos 3 primeiros articulos; 1º articulo dos tarsos posteriores com um annel branco apical; 2º com a area negra, em geral, quasi tão extensa ou mais extensa que a area branca apical..... 11

11 (10a) Os 2 ultimos segmentos abdominaes revestidos dorsalmente de escamas brancas..... *albitarsis brasiliensis*

11a Poucas escamas brancas ou sem taes escamas nos dois ultimos segmentos do abdomen..... 12

12 (11a) Annel branco do 2º articulo dos tarsos anteriores mais extenso que o do 3º..... *albitarsis*

12a Annel branco do 2º articulo dos tarsos anteriores menos extenso que o do 3º..... *darlingi*

13 (1a) Apice do mesosoma com um par de foliolos..... 14

13a Mesosoma sem foliolos..... 15

14 (13) Foliolos curtos, recurvados e denteados..... *argyritarsis*

14a Foliolos longos, quasi rectos, não denteados..... *darlingi*

15 (13a) Lobulos dorsaes da pincetta sem pelos..... 16

15a Lobulos dorsaes da pincetta com pelos..... 18

16 (15) Taes lobulos mais curtos que o mesosoma. *albitarsis* e *brasiliensis*

16a Taes lobulos mais longos que o mesosoma..... 17

17 (16a) Taes lobulos de extremidades arredondadas, com duas expansões vesiculiformes no dorso, antes do apice. *albimanus*

17a Extremidades de taes lobulos expandidas lateralmente em um par de appendices triangulares em forma de orelha..... *bachmanni*

18 (15a) Lobulos dorsaes formando uma peça conica, pilosa da base ao apice, a qual apresenta apenas um sulco ou raphe mediana..... *tarsimaculatus* e *oswaldoi*

18a Lobulos dorsaes pilosos somente na base, com 2 largas expansões apicaes, foliaceas, estriadas ou enrugadas longitudinalmente..... *strodei*

LARVAS.

1 Labios post. do apparelho opercular dos estigmas com um par de longas cerdas..... *darlingi*

1a Labios posteriores do apparelho opercular dos estigmas com cerdas microscopicas. 2

2 (1a) Cerdas internas do grupo thoraxico anterior e submediano com o aspecto de tufos palmados. 3

2a Taes cerdas com ramificações filamentosas, não achatadas... 6

3 (2) Foliolos dos tufos thoraxicos e abdominaes terminados em ponta muita fina. ..... *strodei*

3a Taes foliolos cortados na ponta. 4

4 (3a) 8a. placa abdominal bem maior que a 7a. ..... *bachmanni*

4a 8a. placa abdominal pouco maior que a 7a. 5

5 (4a) Cerdas clypeaes medianas mais longas que as lateraes. *albitarsis brasiliensis*

5a Cerdas clypeaes medianas quasi tão longas quanto as lateraes *albitarsis, tarsimaculatus* e *tarsimaculatus oswaldoi*

6 (2a) Cerdas clypeaes medianas approximadas. Entre a 1ª e 2ª placas dorsaes do abdomen um par de cerdas com ramificações filamentosas. ..... *argyritarsis*

6a Cerdas clypeaes medianas afastadas. Entre a 1a e a 2a placa dorsaes do abdomen um par de tufos palmados. *albimanus*

PUPAS.

1 Tubas respiratoriasem arginadas profundamente no apice. *darlingi*

1a Tubas respiratorias truncadas ou apenas ligeiramente recortados no apice. 2

2 (1a) Espinhos lateraes dos segmentos abdominaes 4–8 muito curtos. ..... *tarsimaculatus oswaldoi*

2a Espinhos lateraes dos segmentos abdominaes 4—8 curtos e robustos. ..... *tarsimaculatus*

2b Espinhos lateraes dos segmentos abdominaes compridos e finos. *argyritarsis, albitarsis, albitarsis brasiliensis, albimanus* e *strodei*

Manguinhos, Agosto de 1928.

BIBLIOGRAPHIA

(1) BLANCHARD, M. R.—Nouvelle note sur les moustiques. C. R. Soc. Biol., 1902, LIV, 795.

(2) BONNE, C.—Remarques sur des *Cellia* sud-américaines. Bull. Soc. Path. Exot., 1924, XVII, 132-137.

(3) BONNE, C. e BONNE-WEPSTER, J.—Mosquitoes of Surinam. 1925. Royal Colonial Institute of Amsterdam. Department of Tropical Hygiene.

(4) BOYD, M. F.—Studies of the epidemiology of malaria in the costal Lowlands of Brazil made before and after the execution of control measures. Ann. Trop. Med. and Parasit., 1926, VII, 45-100. Reprinted from Amer. Jour. Hyg., Monogr. Ser. n. 6, May. Neste trabalho, feito com a collaboração dos Drs. GENESIO DE SOUZA PINTO, ALVARO ANDRADE, SEBASTIÃO FERREIRA

PINTO e GUILHERME SILVA, ha tambem uma nota de ROOT sobre as especies de *Anopheles* encontradas na baixada do Brasil.

(5) BRÈTHES, J. – Algumas notas sobre mosquitos argentinos. An. Mus. Nac. Hist. Nat. Buenos Aires, 1916, XXVIII, 193-218.

(6) BRÈTHES, J. – Description provisoire de 2 espèces nouvelles d'anophelines argentins. La Prensa Medica, 1926, XIII, 106.

(7) BRÈTHES, J. – Notas sobre los Anophelinos Argentinos. Physis, 1926, VIII, 309-313.

(8) CHRISTOPHERS, S. R. – The male genitalia of *Anopheles*. Ind. Jour. Med. Res., 1915, III, 371-394.

(9) CHRISTOPHERS, S. R. – Provisional list and reference catalogue of the Anopelini. Ind. Med. Res. Mem., 3, Dec. 1924, 105 pp.

(10) COVEL, G. – A critical review of the data recorded regarding the transmission of malaria by the different species of Anopheles; with notes on distribution, habits and breeding places. Ind. Med. Res. Mem., 7, July 1927.

(11) DAVIS, N. C. – Notes on the female hypophygia of Anopeline mosquitoes, with special reference to some brazilian species, Amer. Jour. Hyg., 1926, VI, March Suppl. 1-22.

(12) DAVIS, N. C. – A consideration of variability in the *Nyssorhynchus* group of the genus *Anopheles*. Amer. Jour. Hyg., 1928, VIII. 359-563.

(13) DAVIS, N. C. e SHANNON, R. C. – The habits of *Anopheles rondoni* in the Argentine Republic. Amer. Jour. Hyg., 1928, VIII, 448-456.

(14) DYAR, H. G. – The mosquitoes of Americas, Carnegie Institution of Washinton, 1928, Publication n. 387, 616 pp., 18 figs.

(15) EDWARDS, F. W. – The nomenclature of the parts of the male hypopygium of Diptera Nematocera, with special reference to mosquitoes. Ann. Trop. and Parasit., 1920, XIV, 23-40.

(16) EVANS, A. M. Notes on Culicidae collected in Venezuela. Ann. Trop. Med. and Parasit., 1921, XV, 445-454.

(17) HOWARD, L. O., DYAR, H. G. e KNAB, F. – The mosquitoes of North and Central America and the West Indies, IV, 1917, Carnegie Inst. of Wash., Publication 159.

(18) KIRKPATRICK, T. W. – The mosquitoes of Egypt. 1925. Government Press. Cairo.

(19) NEIVA, A – Contribución al studio de los anofelinos argentinos. Separado de La Semana Médica, 1915, n. 48.

(20) NEIVA, A. e BARBARÁ, B. – Mosquitos Argentinos. Buenos Aires, 1917, Imprensa Flaiboy y Camilloni.

(21) NEIVA, A. e PINTO, C. – Contribuição para o conhecimento das anophelinas do Estado do Matto-Grosso com a descripção de uma nova especie., 1922, Brazil Medico, Anno 36, Vol. 2, 231-232.

Fig. 9—*N. tarsimaculatus.* Aza.

Fig. 10—*N. tarsimaculatus.*
Parte central da genitalia do macho.

Phots. J. Pinto

Fig. 11—*N. albimanus* Aza.

Fig. 12—*N. bachmanni*. Aza.

Fig. 13 — *N. bachmanni.*
Parte central da genitalia do macho (exemplar de Campos).

Fig. 14—*N. bachmanni.*
Parte central da genitalia do macho (exemplar de Matto-Grosso).

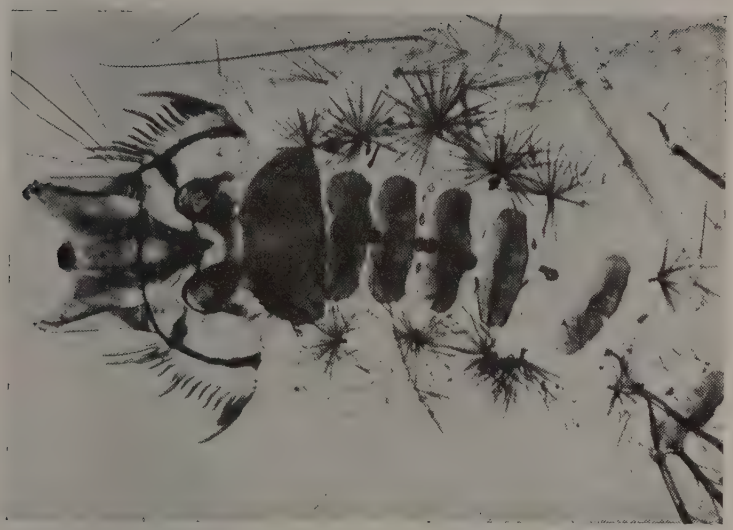


Fig. 15—Parte da exúvia larval de *N. bachmanni*.

Fig. 16—*N. strodei* Aza.

Fig. 17—Parte central da genitalia de *N. strodei*.

Fig. 18—*N. rondoni* Aza

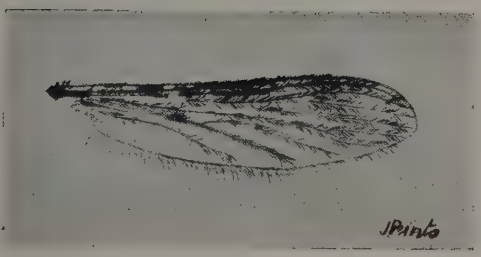


Fig. 19—*N. cuyabensis.* Aza.

Fig. 20—*N. argyritarsis.* Aza.

Fig. 21—Aspecto do mesosoma em *N. argyritarsis*.

Fig. 22—*N. albitarsis*. Aza

Fig. 23—*N. albitarsis* (*brasiliensis*). Aza.

Fig. 24 *N. albitarsis* (*brasiliensis*). Aza.

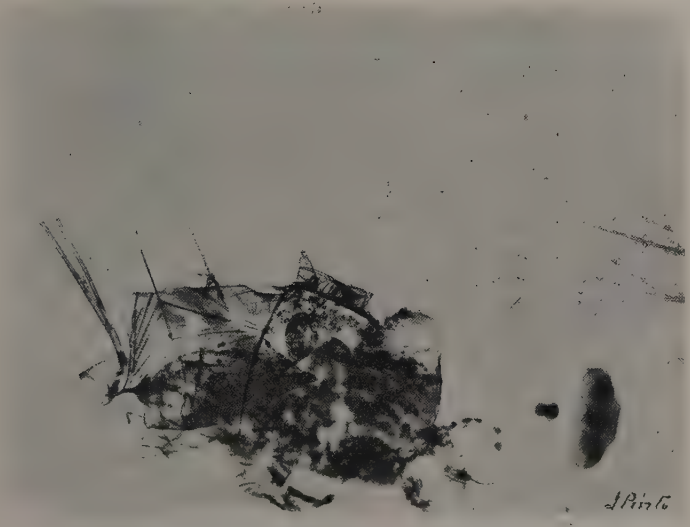


Fig. 25—Parte da exuvia larval de *N. darlingi*.

(22) NEIVA, A. e PINTO C.—Considerações sobre o genero "Cellia" THEOBALD, com a descripção de uma nova especie. 1922, Brazil Medico, Anno 36, Vol. 2, 355-357.

(23) NEIVA, A. e PINTO, C.—Sobre uma nova anophelina brazileira "Cellia cuyabensis" nov. sp. Brazil Medico, 1923, Anno 37, Vol. 1, n. 17, 235-236.

(24) PATERSON e SHANNON.—*Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *davisi* 3ª *Reunión Sociedad Argentina de Pathologia Regional del Norte*, 1927, 649-658 (não consultado).

(25) PERYASSU', A. G.—Os culicideos do Brasil, 1908, 1 vol. Typ. Leuzinger. Rio de Janeiro.

(26) PERYASSU', A. G.—Os anophelineos do Brasil. Arch. Mus. Mac. Rio de Janeiro, 1921, XXII, 9-104.

(27) PERYASSU', A. G.—Duas novas especies de mosquitos do Brasil. A Folha Medica, III, 179.

(28) PETROCCHI, J.—Anofelino transmissor de malaria encontrado en la Capital Federal. Rev. Inst. Bact. Buenos Aires, 1919, II, 295-302.

(29) PETROCCHI, J.—Las especies argentinas del genero Anopheles. Physis, 1923, VII, 139.

(30) PETROCCHI, J.—Mosquitos transmissores. Dep. Nac. de Hygiene, Buenos Aires, Argentina, 1924, 38 pp.

(31) PETROCCHI, J.—Descripcion de un nuevo *Anopheles*. Rev. Inst. Bac. Buenos Aires, 1925, Iv, 1, 69-75.

(32) PINTO, C.—Classificação e distribuição geographica dos anophelinos do Novo Mundo. Capitulo do Livro do Prof. MIGUEL COUTO.—Impaludismo por autores brasileiros, 1927, 271-277.

(33) PINTO, G. DE SOUZA.—Sobre um novo methodo de identificação dos anopheli neos brasileiros. D. N. S. P. Serviço de Saneamento Rural do Estado do Rio de Janeiro, 1925, Publ. n. 2.

(34) ROOT, F. M.—The classification of American Anopheles mosquitoes. 1922, Amer. Jour. Hyg., II, 321-322.

(35) ROOT, F. M.—The larvae of American Anopheles mosquitoes in relation to classification and identification. Amer. Jour. Hyg., 1922, II, 379-393.

(36) ROOT, F. M.—The male genitalia of some American Anopheles mosquitoes. Amer. Hyg., 1923, III, 264-279.

(37) ROOT, F. M.—Further notes on the male genitalia of American Anopheles. Amer. Jour. Hyg., 1924, IV, 456-465.

(38) ROOT, F. M.—Studies on brazilian mosquitoes. I. The Anopheles of the *Nyssorhynchus* group. Amer. Jour. Hyg., 1926, VI 684-417.

(39) ROOT, F. M.—Studies on brazilian mosquitoes. II. Chagasia Fajardoi. Amer. Jour. Hyg., 1927, VII, 470-480.

(40) THEOBALD, V.—The classification of the Anophelina. Jour. Trop. Med. and Hyg. (London), 1902, V, 181-183.

Acção dos saes biliares sobre o tracto genital das cobayas.

Pelos Drs. THALES MARTINS e DORIVAL MACEDO.

M. A. GSELL-BUSSE publicou recentemente (1) interessantes observações acerca da influencia do taurocholato de sodio commercial sobre a genitalia dos roedores.

Administrado por injecções subcutaneas diarias, a partir de 5 dias já provoca modificações notaveis nos orgãos sexuaes; nas femeas (o autor trabalhou com ratos, coelhos e cobayas) ha uma acceleração no desenvolvimento do utero e vagina, que podem attingir um peso 4 a 13 vezes superior ao dos animaes testemunhas. Reciprocamente, sobre os machos, o taurocholato tem uma acção antimasculina nitida. O peso dos testiculos nos testemunhas é 3 a 4 vezes superior ao dos tratados.

Esses factos são da maior importancia, porque poderiam trazer novos esclarecimentos, ou abrir novas trilhas para pesquizas, no dominio da hormonologia.

Seria necessario verificar si os effeitos correm por conta do taurocholato, ou de impurezas que o acompanhem; e ainda repetir as experiencias com o glychocholato.

Dada a origem dos saes biliares commerciaes, não se comprehende bem que contenham sempre quantidade apreciavel de hormonio ovariano; pouco provavel ainda uma acção directa delles sobre os orgãos genitaes. A hypothese mais plausivel seria admittir que nos processos de extracção da bilis, determinadas substancias acompanham os saes, essas dotadas dos effeitos especificos citados. A reciprocidade de acção, isto é, positiva quanto á genitalia feminina, inhibidora sobre a masculina, tenderia a approximal-a do hormonio ovariano, notadamente o Menformon de LAQUEUR (2).

Depois de terminadas as nossas pesquizas, lemos uma nova nota de GSELL-BUSSE (3), relatando que a substancia activa póde ser extrahida pelo ether, da bilis de machos ou de femeas. O sexo do doador não importa nos effeitos. Foi obtida de material provindo de homens e mulheres, e tambem de cães, porcos, bois e vaccas. A bilis de bois e de vaccas contem até 800 U. R. (unidades rato) de substancia estrogenica por litro.

O presente trabalho vale por uma verificação de que os saes biliares purificados não têm as propriedades em questão, e portanto directamente não influem nos resultados.

Utilizámos taurocholato e glychocholato de sodio Merck; em solução aquosa a 3 %, eram injectados todos os dias subcutaneamente. Os animaes escolhidos foram as cobayas jovens, separados os machos das femeas, ten-

(1) Pflügers Arch. Physiol., 219, p. 626, 1928.
(2) Klin. Woch., 6, 390, 1927.
(3) Klin. Woch., 7, p. 1606, 1928.

do todas a mesma alimentação (capim e farello). Empregámos 56 animaes; em vista da mortalidade (como tambem succedeu a GSELL-BUSSE) terminámos a serie com 20.

Os animaes eram finalmente sacrificados com chloroformio, e os orgãos isolados cuidadosamente e pesados com precisão. Os quadros adiante dão os esclarecimentos necessarios.

Verifica-se que ha oscillações no peso das visceras, mesmo entre os controles; isso é explicavel pela phase de desenvolvimento em que se encontravam, a phase de crescimento dysharmonico da puberdade.

Na primeira serie, nota-se um atrazo no crescimento da genitalia nos injectados, machos ou femeas, interpretavel pela acção toxica dos saes na ausencia de substancias estimulantes.

Na serie II, foi reduzida a doze de substancia injectada; nessa, em alguns animaes o peso do utero e ovarios é pouco superior ao dos controles, emquanto que em outros é nitidamente inferior; mas as oscillações ficam dentro das variações normaes. Nas experiencias de GSELL-BUSSE, a genitalia dos injectados é de 4 a 13 vezes maior que nos controles.

Parece, portanto, licito concluir que os saes biliares, per se, não promovem acções semelhantes á dos hormonios sexuaes.

Qual a natureza da substancia activa existente na bilis?

LOEWE (4) denominou "Thelykininas" as substancias existentes no reino vegetal, com propriedades similares ás do hormonio ovariano, por analogia aos insulinoides glycokininas.

DOHRN e BLOTEVOGEL (5) verificaram a presença dessas Thelykininas em sementes de beterraba, raizes de salsa (Apium petroselinum), na batata commum e nas cellulas de levedura. A caracterisação é feita com o test de ALLEN e DOISY (estro na camondonga castrada), hoje universalmente adoptado.

De passagem, podemos citar experiencias nossas feitas com o apiol, tambem chamado camphora de salsa. E' um agente pharmacólogico, usado nas desordens menstruaes; dada a circumstancia de se obter o estro na camondonga castrada, pela injecção de extractos da planta, impunha-se verificar si esse corpo tambem possue propriedades estrogenicas.

Quando se conseguisse, com um composto definido, provocar o cio no animal castrado, haveria duas conclusões importantes a tirar: ou a substancia em questão tem constituição similhante á do hormonio ovariano, ou então o test de ALLEN e DOISY não é especifico.

As experiencias foram negativas; mesmo com doses elevadas (3 milg. de apiol branco cristalisado de Merck, por dia); o aspecto histologico do muco vaginal em nada se modificou. Ainda neste caso a substancia activa escapa á verificação chimica.

Podemos concluir que a bilis dos mammiferos é via de excreção de determinadas thelykininas; tratando-se de um humor altamente concentrado, é possivel que as thelytropinas vindas com a alimentação ahi attinjam concentrações maiores que na urina. A significação que ellas possam ter na biologia vegetal está ainda por elucidar.

---

(4) Deut. Med. Woch., 1926, p. 1685.
(5) Med. Klin., 1928, p. 1328.

SERIE I — Cobayos ♀

N. de ordem	Peso inicial	Peso final	Peso do utero e ovarios	Peso do figado	Substancia injectada	N. de injecções	Dose total	Duração do tratamento
8	202	208	145 mg.	6,88 gr.	Glycho.	12	0,74 gr.	16 dias
9	238	352	558 mg.	14,5 gr.	—	—	—	Test.
2	255	302	270 mg.	12,5 gr.	Tauro	12	0,61 gr.	16 dias
			Peso dos testiculos	Cobayos ♂				
2	302	258	162 mg.	11,6 gr.	Tauro	12	0,69 gr.	16 dias
7	141	216	224 mg.	9,2 gr.	—	—	—	Test.
15	235	283	840 mg.	12,6 gr.	—	—	—	Test.

SERIE II — Cobayos ♀

N. de ordem	Peso inicial	Peso final	Peso do utero e ovarios	Peso do figado	Substancia injectada	N. de injecções	Dose total	Duração do tratamento
6	131	157	174 mg.	6,15 gr.	Tauro.	11	0,28 gr.	17 dias
11	158	161	108 mg.	7,85 gr.	Glycho.	11	0,29 gr.	17 dias
17	180	173	205 mg.	7,6 gr.	Tauro.	7	0,21 gr.	13 dias
5	127	187	200 mg.	6,85 gr.	—	—	—	Test.
16	184	193	140 mg.	8,58 gr.	Glycho.	8	0,24 gr.	13 dias
18	178	195	202 mg.	8,16 gr.	Tauro.	8	0,20 gr.	13 dias
9	173	211	216 mg.	7,5 gr.	Glycho.	11	0,29 gr.	17 dias
19	182	211	180 mg.	7,5 gr.	—	—	—	Test.
12	167	227	150 mg.	6,6 gr.	—	—	—	Test.
13	219	318	460 mg.	13,8 gr.	—	—	—	Test.
			Peso dos testiculos	Cobayos ♂				
12	141	132	63 mg.	4,57 gr.	Glycho.	11	0,29 gr.	17 dias
17	—	123	80 mg.	3,83 gr.	—	—	—	Test.
16	175	204	113 mg.	6,3 gr.	Tauro.	8	0,20 gr.	13 dias
11	150	217	210 mg.	6,5 gr.	—	—	—	Test.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

Sobre alguns cryphalineos observados em sementes de cacaoeiro e de cafeeiro

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

Quando publiquei algumas notas sobre o *Stephanoderes seriatus* EICHHOFF (1) fiz referencias a uma serie de exemplares colhidos na Bahia em fructos de cacaoeiro e de cafeeiro por G. BONDAR.

Taes exemplares, uns maiores do genero *Stephanoderes*, outros menores do genero *Hypothenemus*, foram, nessa occasião, superficialmente examinados. Pude, entretanto, notar que os primeiros, na sua maioria, embora muito semelhantes aos especimens de *seriatus*, daqui e dos Estados do Rio e de São Paulo, apresentavam algumas differenças, que assignalei e mesmo figurei no alludido trabalho.

Acreditando tratar-se de uma variedade ou mesmo especie differente do *S. seriatus*, entreguei alguns desses exemplares a CARLOS MOREIRA, pedindo-lhe que os remettesse a EGGERS para resolver a questão. Infelizmente o referido material estraviou-se e assim nada se poude obter deste especialista.

Revendo agora com mais vagar os especimens que ficaram em meu poder, verifiquei haver, de facto, no materiel enviado por BONDAR, tres especies bem differentes de *Cryphalinae*: o insecto que foi determinado por EGGERS como sendo o *S. seriatus*, um *Hypothenemus* e a outra forma de *Stephanoderes*, ainda não estudada, cuja descripção, apresentada linhas a seguir, será feita comparativamente com o que se observa no *seriatus*. Classifical-a-ei tambem como um *Hypothenemus* pelas razões que exporei quando tratar da outra especie deste genero.

Hypothenemus heterolepis sp. n.

Proximo do *H. seriatus*, porem mais longo (1,75 mm.) e de côr mais clara (côr castanha em todo o corpo).

Examinando-se o insecto de lado, nota-se o seguinte: a giba prothoraxica é um pouco mais saliente e de declividade anterior mais abrupta que em *seriatus*; os elytros reunem-se em cima formando uma linha recta até a declividade posterior e não ligeiramente arqueada desde a base como em *seriatus*.

Dentes da rugosidade prothoraxica mais robustos e numerosos que em *seriatus*. Corôando em cima o bordo apical do prothorax ha 2 dentes medianos e 3 ou 4 de cada lado, maiores que os medianos. Pontuação dos elytros bem mais fina que em *seriatus*.

Como nesta ultima especie os intersticios elytraes são brilhantes e

(1) COSTA LIMA, Sobre a broca do café, Chacaras e Quintaes, 1924, XXX, 414-415, fig. 1.

—Notas sobre o *Stephanoderes seriatus* EICHHOFF, Bol. Minist. Agric Ind. Com., 1925, XIV, 3, p. 198.

ornados de escamas espatuladas, longitudinalmente estriadas e com pellos microscopicos ao longo das estrias. Taes escamas, porem, são um pouco mais alongadas que em *seriatus*.

Alem dessas escamas ha tambem nos intersticios, alternando com ellas e de cada lado das series que constituem, escamas lanceoladas, com uma estria longitudinal da base ao apice (v. fig. 4).

Tibias anteriores, em geral, mais denteadas no bordo externo que em *seriatus*.

Alem destes caracteres ha ainda a considerar o aspecto da spermatheca, bem differente nas duas especies como se pode ver nas figs. 7—10.

A estructura do proventriculo é muito semelhante a desse orgão no *hispidulus*.

Cotypos, na collecção entomologica do Instituto.

? **Hypothenemus hispidulus** (LE CONTE)

Muito se escreveu, não sómente sobre esta especie, como em relação ao *H. eruditus* WESTW. Aliás ambas são muito semelhantes, pois a principal differença entre ellas, a julgar pelas respectivas descripções, está na côr do prothorax, que em *eruditus* é vermelha testacea, emquanto que em *hispidulus* é picea escura, isto é, igual a dos elytros.

Os exemplares de *Hypothenemus* que me foram enviados da Bahia por BONDAR, pela côr picea uniforme e pelos principaes caracteres morphologicos, parecem pertencer á especie descripta por LE CONTE. O mesmo posso dizer com relação a uma serie de exemplares que retirei de um galho secco, actualmente guardados no vidro nº. 675, do Gabinete de Entomologia da Escola Superior de Agricultura e Medicina Veterinaria.

Todavia, em todos esses especimens não ha na fronte a linha mediana brilhante que HOPKINS assignala nos exemplares de *hispidulus*; nota-se apenas uma pontuação esparsa, sem outras depressões ou saliencias. O comprimento varia nas femeas de 1 a 1,2 mm. Os machos, em geral, são menores que as femeas (0,75 mm), porém, ás vezes, são tão longos quanto ellas ou mesmo mais longos que as de porte reduzido. O bordo apical do prothorax apresenta uma corôa de 6 dentes subiguaes. O revestimento dos elytros é semelhante ao de *H. heterolepis*, isto é, além da pilosidade das pontuações e das escamas espatuladas, aliás mais estreitas no insecto que penso ser o *hispidulus*, ha tambem escamas lanceoladas do typo das que se observa em *heterolepis*.

A spermatheca é tambem parecida com a de *heterolepis*, como se pode ver na fig. 11. A moela ou proventriculo é do typo da que se encontra nos *Stephanoderes* que tenho estudado.

Como se sabe o unico caracter generico que separa *Stephanoderes* de *Hypothenemus* é haver no funiculo antennal de *Stephanoderes* 5 segmentos e no de *Hypothenemus* apenas 4 (2). Ora essa distincção, como mostrarei,

(2) Os especialistas em Scolytoidea consideram o pedicello como 1º segmento do funiculo. Este modo de considerar a antenna não me parece, entretanto, o mais correcto. De facto, nas antennas geniculo-clavadas ha 4 partes perfeitamente distinctas: o escapo, o pedicello, o funiculo e a clava. Ora, se aquelles autores separam o funiculo da clava, quando muitas vezes o segmento distal daquelle se apresenta mais ou menos fundido com a clava, não me parece razoavel que considerem o pedicello, que é sempre bem distincto dos demais segmentos, como parte integrante do funiculo.

não me parece ter a importancia que lhe deram e que ainda lhe dão alguns autores modernos.

O proprio EICHHOFF, creador do genero *Stephanoderes*, foi o primeiro a dizer (3) que uma parte das especies, senão todas, por elle descriptas como sendo do genero *Stephanoderes* eram congenericas com *Hypothenemus eruditus*. Procurou, entretanto, demonstrar que o genero *Hypothenemus* WESTWOOD (1836), embora tendo prioridade sobre o genero *Stephanoderes* por elle creado (1871), não podia ser considerado valido, por ter sido fundado sobre um caracter não existente (funiculo antennal de 3 segmentos), visto ter observado 5 segmentos no funiculo antennal de *H. eruditus*. Entretanto, como bem disse BLANDFORD (4), não ha razão para se duvidar da affirmação de WESTWOOD, pelo menos com relação ao exemplar por elle disseccado. Ademais, admittindo-se mesmo que esse caracter não tenha valor diagnostico, o genero foi bem fundamentado e perfeitamente distincto na época em que foi creado. Aliás, é quasi certo que não tenha havido erro na observação de WESTWOOD, pois recentemente HOPKINS, examinando varias especies do genero *Hypothenemus*, verificou que os machos de algumas apresentam apenas 3 segmentos no funiculo.

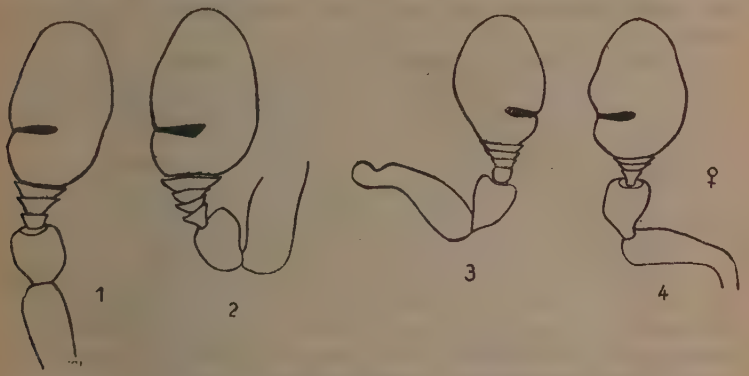


Fig. 1. Antennas de *Hypothenemus hispidulus*.
1 e 2—De um exemplar ♂.
3—De outro ♂.
4—Da femea.

Disseccando varios especimens do *Hypothenemus*, que me parece identico ao *H. hispidulus*, observei o que se segue. Nas femeas ha, de facto, pelo menos nos especimens por mim examinados, 4 segmentos no funiculo (fig. 1: 4). Nos machos, porém, essa parte da antenna varia consideravelmente. Em alguns ha 4 segmentos. Em 2 que dissequei, montando cuidadosamente as antennas em balsamo, vi a antenna de um lado com 4 segmentos e a do outro com 5, isto é, exactamente como em *Stephanoderes* (fig. 1: 1, 2 e 3). Em outro exemplar, que apresentava apenas uma antenna, contei sómente 3 segmentos no funiculo.

(3) EICHHOFF, W., Remarks on the synonymy of some North American scolytid beetles. 1896, Proc. U. S. Nat. Mus., XVIII, p. 608.

(4) BLANDFORD, Biol. Centr. Amer., 1904, Col. IV, 6, p. 226.

Por outro lado nota-se identica variação nas antennas dos machos de *Stephanoderes*. HOPKINS (5), na diagnose do genero, diz "funiculo antennal de 5 segmentos, algumas vezes com 4 articulos no macho". Em varios exemplares de *hampei* e de *seriatus* que examinei, vi, não sómente funiculos de 4, como até mesmo de 3 segmentos. Nestes casos a clava apresenta, na base e no lado do septo, geralmente pouco abaixo delle, um entalhe mais ou menos profundo, porém não attingindo o outro bordo da clava.

Tendo em vista taes variações, não sei porque razão ainda se considera o genero *Stephanoderes* como valido. Apenas, para os separar, ha o aspecto do funiculo antennal nas femeas (4 segmentos em *Hypothenemus* e 5 em *Stephanoderes*). Resta, porem, saber se, mesmo nas femeas, esse caracter é constante. Em *Hypothenemus eruditus*, como já disse WESTWOOD, no exemplar que examinou, contou 3 segmentos (não se sabe exactamente se era macho ou femea). EICHHOFF considerou o funiculo dessa especie como apresentando 5 segmentos e HOPKINS (6), que examinou uma femea da serie typica do *H. eruditus*, encontrou apenas 4.

Se pela morphologia externa as especies dos 2 generos se confundem, a ponto de muitas dellas, como *hampei*, *hispidulus*, etc., terem sido designadas, ora como *Hypothenemus*, ora como *Stephanoderes*, pela organisação interna nada ha que justifique a sua distribuição em 2 generos distinctos.

A estructura do proventriculo é praticamente a mesma nos dois generos e, das especies que estudei, a que indubitavelmente é um *Hypothenemus* apresenta a spermatheca bem semelhante a de *heterolepis*, especie esta que seria certamente classificada como *Stephanoderes*.

Baseado, pois, no material que examinei e nas considerações que acabo de fazer, acho que BLANDFORD teve toda a razão em considerar o genero *Stephanoderes* na synonymia de *Hypothenemus*.

Resta-me ainda dizer algumas palavras sobre o *seriatus*.

Com frisei n'uma nota inclusa n'um trabalho sobre o caruncho do café, que será publicado no volume IX dos *Archivos da Escola Superior de Agricultura*, não fosse EGGERS ter identificado os especimens que lhe foram remettidos por MOREIRA com o typo de EICHHOFF e não poderia pensar em tal identidade.

Uma especie que realmente apresenta grandes affinidades com esses nossos especimens, é a que foi descripta por NÖRDLINGER (Nachtr. zu Ratzeburg Forstinsekten, 1856, p. 74) com o nome – *Bostrichus plumeriae*, de material colhido na Venezuela.

Mais tarde EICHHOFF (Ratio Tomic., 1879, p. 164) reestudou-a, sob o nome de *Stephanoderes plumeriae*, com material colhido na Bahia.

Ora, segundo BLANDFORD, *H. plumeriae* "is very closely allied to *H. seriatus*, and is perhaps hardly distinct". Seria pois conveniente verificar-se se *seriatus* é ou não identico a *plumeriae* e, no caso de serem especies distinctas, a qual das duas especies devem realmente pertencer os

---

(5) HOPKINS, A. D., Classification of the Cryphalinae with descriptions of new genera and species. 1915, U. S. Dept. of Agric., Rep. n. 99 (Bur. of Entom.), p. 21.

(6) HOPKINS, A. D., Preliminary classification of the Superfamily Scolytoidea. 1915, U. S. Dept. Agric., Bur. Entom. Techn. Ser. No. 17, T. II, p. 222.

exemplaras brasileiros. E as minhas duvidas são tanto mais admissiveis, porquanto recentemente (1925) STAHEL observou tambem na Guyana Hollandeza um *Stephanoderes* muito semelhante ao *hampei*, porem de especie differente, julgada ser o *S. plumeriae* NÖRDL.

Havendo na collecção entomologica da Escola Superior de Agricultura exemplares de *seriatus* obtidos de sementes de algodoeiro, que foram quasi totalmente roidas pelo insecto, é de suspeitar-se que o *S. gossypii* HOPKINS, de Cuba, seja identico aos nossos especimens e, consequentemente, tambem identico a *plumeriae* ou a *seriatus*.

SIMMONDS (7) diz ter encontrado em sementes de algodão um *Hypothenemus gossypii* SAMP. Creio, entretanto, que se trata de um *nomen nudum*, pois, não me consta que SAMPSON tenha descripto qualquer *Hypothenemus* com esse nome.

NOTA ADDICIONAL.

Já estava escripta a nota que acabo de apresentar quando, por gentileza do meu collega CARLOS MOREIRA, tive o prazer de examinar os ipideos da collecção do Instituto Biologico de Defesa Agricola. Ha nessa collecção uma boa serie de especimens de *seriatus*, remettidos de varios pontos do paiz (D. Federal, Estados do Rio, São Paulo, Minas, Bahia e Parahyba) e colhidos em fructos, e galhos de varias plantas (algodoeiro, cacaoeiro, cafeeiro, coqueiro, figueira da India e laranjeira). Taes especimens são perfeitamente semelhantes aos que estão na mesma collecção, determinados por EGGERS como—*S. seriatus*. Comparei-os todos com 9 exemplares de *Stephanoderes plumeriae*, determinados por MARSHALL, tambem guardados na mesma collecção e obtidos de café colhido em Paramaribo (Guyana Hollandeza) em Julho de 1925.

Dissequei tambem um destes ultimos exemplares, especialmente para examinar a spermatheca. Desse estudo resultou ficar convencido que o *S. seriatus* é identico ao *S. plumeriae*. Sómente na côr dos especimens é que se nota alguma differença. Nos de *seriatus*, determinados por EGGERS, ella é, em geral parda, mais ou menos escura, emquanto que nos de *plumeriae* é quasi negra. Aliás nos demais especimens de *seriatus*, como em outros ipideos, a côr varia, mesmo em insectos sahidos de um mesmo material, havendo exemplares completamente negros como os de *plumeriae*. Todavia, pelos caracteres morphologicos externos e pelo aspecto da spermatheca não ha, como verifiquei, differenças notaveis entre os exemplares considerados como pertencentes a duas especies distinctas. Assim, a meu ver, *seriatus* é identico a *plumeriae*.

Dou, a seguir, as informações bibliographicas relativas a especie em questão.

---

(7) SIMMONDS, H. W., Cotton insect pests recorded in Fiji, 1924, Agric. Circ. Dept. Agric. Fiji, V., 1, pp. 61-62. Suva, Jan.-Jun.

Hypothenemus plumeriae (NÖRDLINGER).

Bostrychus plumeriae NÖRDLINGER, Nachtr. zu Ratz. Forstins., 1856, p. 74.
Cryphalus plumeriae, FERRARI, Die forst-und baumzuchtschädlichen Borkenkäfer, etc., 1867, p. 17.
Cryphalus (*Ernoporus*) *plumeriae*, FERRARI, Nachträge, Berichtigungen und Aufklärungen uber zweifelhaft gebliebene Arten in: "die forst-und baumzuchtschädlichene Borkenkäfer (Tomicidi LAC.) etc. Berl. ent. Zeitschr., XII, 1868, p. 252. (=*Ern. jalapae* LETZN., 1844).
Stephanoderes seriatus EICHH., Neue exotische Tomiciden Arten, XV, 1871.
Stephanoderes seriatus, EICHH., Rat. Tomic., 1879, p. 158.
Stephanoderes plumeriae, EICHH., Rat. Tom., 1879, p. 164.
Stephanoderes polyphagus COSTA LIMA, Jornal do Commercio, Rio de Janeiro, 19 de Outubro de 1924.
Stephanoderes fallax COSTA LIMA, Jornal do Brasil, Rio de Janeiro, 23 de Outubro de 1924.
« « , Chacaras e Quintaes, S. Paulo, XXX, 5, 15 de Novembro de 1924, p. 414, fig. 1.
Stephanoderes largipennis PIZA JUNIOR, Rev. Soc. Rur. Bras., São Paulo, Novembro, 1924.
Stephanoderes fallax, BONDAR, As brocas do café, Correio Agricola, III, 1, 11-13, Bahia, Janeiro, 1925.
Stephanoderes largipennis, PIZA JUNIOR, Uma especie nova do genero *Stephanoderes* (*S. largipennis* sp. n.), Outubro 1924 (Publicado em 1925).
Stephanoderes seriatus, MOREIRA, C., A broca do café, *Stephanoderes coffeae* HAG., Instituto Biologico de Defeza Agricola, bol. 3, 1925, p. 8.
« « , COSTA LIMA, Notas sobre o *Stephanoderes seriatus* EICHHOFF, Bol. Minist. Agric. Ind. e Comm., Rio de Janeiro, XIV, 2, Fev. 1925, 194-199 e XIV, 3, Março 1925, 365-368.
« « , CAMINHA FILHO, Relatorio, etc., do Auxiliar do Inspector Agric., Bol. Minist. Agric. Industria e Comm., XV, (1), 2, 122-127, Fever. 1926.
« « , OLIVEIRA FILHO, Contribuição para o conhecimento da broca do café. Comm. do Est. e Debell. da Praga Cafeeira, São Paulo, publ. 20, 1927, pags. 17, 39, 44, 45, 47, 48 e 49.
« « , MOREIRA, C., Insectos nocivos ao cafeeiro no Brasil. Rev. Soc. Rur. Bras., VIII, 92, 24-25, Jan. 1928.
« « , PIZA JUNIOR, *Stephanoderes hampei* (O caruncho do café). Publ. da Secret. da Agric. Industr. e Comm. do Estado de S. Paulo, 1928, 42-44.
« « , COSTA LIMA, Notas sobre o *Stephanoderes seriatus* EICHHOFF, Arch. Esc. Sup. Agric. Med. Veter., IX, 1928 (no prelo).

Fig. 2—Escamas e cerdas elytraes em *H. plumeriae* (*H. seriatus*).

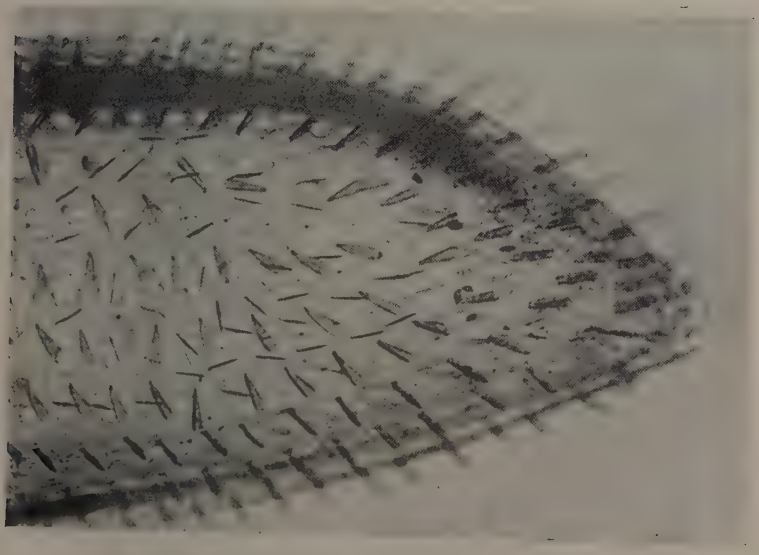


Fig. 3—Parte apical de um dos elytros de *H. heterolepis*.

Encontrei tambem, na referida collecção, 3 exemplares de *Hypothenemus*, 2 de Cantagallo (E. do Rio) e um de Deodoro (D. Federal), retirados de café, que me parecem pertencer á especie descripta por EICHHOFF, de exemplares de Nova Granada, sob o nome – *Stephanoderes opacus*.

Nesta especie, que é relativamente grande, pois mede 2 mm. de comprimento, ha na margem apical do prothorax 2 dentes proeminentes, e não varios dentes, como se observa na maioria das especies de *Hypothenemus*. Os referidos exemplares são de côr negra e apresentam tambem caracteres de accôrdo com a descripção de *H. validus* BLANDFORD, aliás considerado pelo autor, que poude comparal-o com um especimen typico de *opacus*, como sendo talvez uma variedade desta especie.

Finalmente, examinei 5 exemplares, ainda da mesma collecção, de *H. fuscicollis* (EICHHOFF) (*Stephanoderes*), um delles determinado por EGGERS, todos procedentes de Cataguazes (Minas) e colhidos em bagas de cafeeiro pelo eng. agron. EDGARD DA SILVA CALDEIRA (Julho de 1925).

Trata-se de uma outra especie de *Hypothenemus* que, pelo tamanho (1,70 mm.) e côr, pode tambem ser confundida com o *H. hampei*. Todavia é muito facil distinguil-a do caruncho praga do café.

As rugosidades ou dentes prothoraxicos, embora bem salientes, são menos numerosos e mais esparsos que em *hampei*; o bordo apical do prothorax apresenta sómente 2 dentes e não 4 ou mais como *hampei*; os elytros apresentam uma pontuação finissima e não relativamente larga e profunda como em *hampei* e *plumeriae*, alem disso são ornados, principalmente na parte declive, de cerdas pallidas, mais longas e finas que as de *hampei*.

Manguinhos, Novembro de 1928.

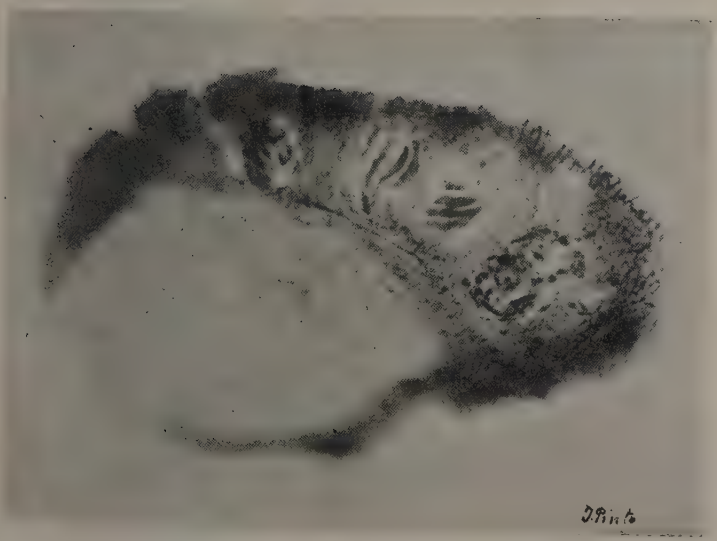
Sobre os cogumelos da piedra brazileira

Pelos Drs. O. DA FONSECA e A. E. DE ARÊA LEÃO.

Em cerca de seis annos reunimos no Laboratorio de Mycologia do Instituto Oswaldo Cruz material brazileiro de vinte e oito casos de piedra dos cabellos, casos por nós mesmos observados no Rio de Janeiro ou communicados dessa cidade pelos Drs. EDUARDO RABELLO, ALCIDES GODOY e FLAVIO DA FONSECA, da Bahia pelo Dr. OCTAVIO TORRES, de Santos pelo Dr. SAMUEL LEÃO DE MOURA, de Cuyabá pelo Dr. EPAMINONDAS e de Bello Horizonte pelo Dr. AROEIRA NEVES. A pequena vitalidade dos parasitos nos nodulos de piedra impediu que de muitos casos pudessemos obter culturas.

Devemos notar que todos os casos observados eram perfeitamente comparaveis, os nodulos caracteristicos em torno dos cabellos apresentando sempre o mesmo aspecto, negros, duros, muito adherentes ao pello, de pequenas dimensões e fórma arredondada, os maiores mostrando, tanto nos preparados de pellos clarificados e dissociados a quente na potassa a 40 % ou no lactophenol de AMMAN, como nos córtes histologicos, as formações especiaes reconhecidas e descriptas em 1911 por PARREIRAS HORTA. Este ultimo autor mostrou que os nodulos da piedra observada no Brazil incluiam formações arredondadas especiaes, que chamou *cystos* e que continham cada uma varios elementos fusiformes ciliados. A importancia que para a systematica tinha essa verificação levou BRUMPT a separar sob o nome de *Trichosporum hortai* o cogumelo da fórma brazileira de piedra do da fórma colombiana, pelos autores geralmente denominado de *Trichosporum giganteum.* Temos a impressão de que os casos colombianos de piedra não têm sido sufficientemente estudados nestes ultimos decennios para que se possa affirmar a não existencia nelles das fórmas cysticas descriptas por HORTA. Parece-nos, ao contrario, muito mais provavel que as manchas claras arredondadas que DESENNE descreveu ha tanto tempo nos casos da Colombia não sejam outra coisa mais do que os cystos encontrados por HORTA e por elle bem descriptos nos casos do Brazil. Si assim fôr, será necessario procurar outros fundamentos para a distincção entre as duas especies. O que, porêm, se pode concluir desde logo do estudo da litteratura sobre os casos europeus de piedra e da observação directa dos casos brazileiros é que, clinica e parasitologicamente, piedra européa e piedra brazileira são tão differentes que não se podem ver motivos para a collocação dos parasitos respectivos num mesmo genero. Os cystos descriptos por HORTA têm toda a apparencia de verdadeiros ascos e, mesmo que com taes formações não possam elles ser identificados, sua presença basta para fazer separar nitidamente os parasitos da piedra brazileira em um genero aparte.

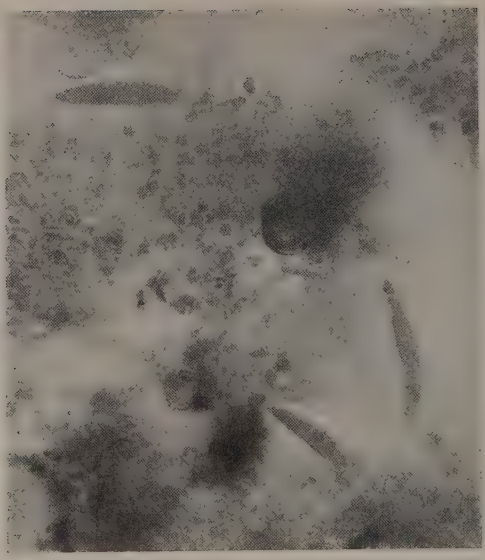
Dos casos mais recentes de que obtivemos material, isolámos as duas fórmas culturaes já conhecidas dos parasitos da piedra sul-americana. Uma, primeiro descripta por EDUARDO RABELLO, depois por PARREI-



Figs. 1 e 2—Cortes transversos de nodulos peripillares em um caso de piedra brazileira. Vêm-se os cystos descriptos por HORTA contendo espóros fusiformes encurvados.

Figs. 1 and 2—Transversai sections of hair nodules in a Brazilian case of piedra. The cysts described by HORTA may be seen, containing curved fusiform spores.

Microphot. J. Pinto



Figs. 3 e 4 – Espóros fusiformes da *Piedraia hortai* em cultura de dois mezes, em cenoura.

Figs. 3 and 4—Fusiform spores of *Piedraia hortai* in two months old culture on carrot.

Microphot. J. Pinto

RAS HORTA, dá colonias quasi negras, seccas, recobertas de pellos, a ella correspondendo a designação creada por BRUMPT de *Trichosporum hortai*. A outra, que JUHEL-RENOY foi o primeiro a descrever dá colonias brancas ou amarelladas, glabras, seccas ou humidas, de superficie rugosa e ás vezes cerebriforme, aspecto que a approxima das especies européas e asiaticas do genero *Trichosporum*. As culturas dessa ultima fórma têm sido muito pouco estudadas. E' de notar que, de um mesmo caso de piedra se podem isolar as duas fórmas culturaes acima referidas. Esse facto deixa aberta a questão de saber qual das duas fórmas de cogumelo isolado é o verdadeiro formador dos nodulos piedricos.

Nas amostras que dão colonias quasi negras e correspondendo á descripção do *Trichosporum hortai*, acabamos de verificar uma particularidade interessante. Mostram ellas nas velhas culturas em cenoura, datando de cerca de dois mezes, espóros fusiformes, ás vezes ondulados, geralmente encurvados, de coloração amarella-esverdeada, extremidades afiladas e se continuando cada uma com um delgadissimo appendice filamentoso de 30 ou mais micra de comprimento, hyalino e mais ou menos rectilineo. Esses espóros que medem de comprimento 30 micra por 10 de largura, são identicos aos encontrados nos nodulos peripillares nos casos de piedra entre nós observados. Sua presença na fórma parasitaria e na fórma cultural do cogumelo productor da piedra servirá para caracterisar um novo genero que aqui estabelecemos, para elle propondo o nome de *Piedraia, n. g.* A especie typo desse novo genero será a *Piedraia hortai* (BRUMPT, 1913), no caso de não ser essa especie synonyma do *Trichosporum giganteum* BEHREND, 1890, productor da piedra da Colombia.

(Laboratorio de Mycologia do Instituto Oswaldo Cruz e Laboratorio da Clinica Dermatologica da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro).

On the fungus of Brazilian piedra

By O. DA FONSECA and A. E. DE ARÊA LEÃO.

During some six years, we have collected in the Mycological Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute, material from twenty eight Brazilian cases of hair piedra, which cases have been either observed by ourselves in Rio de Janeiro or have been communicated to us from the same place by Professor EDUARDO RABELLO and Drs. ALCIDES GODOY and FLAVIO DA FONSECA, from Bahia by Dr. OCTAVIO TORRES, from Santos by Dr. SAMUEL LEÃO DE MOURA, from Cuyabá by Dr. EPAMINONDAS and from Bello Horizonte by Dr. AROEIRA NEVES. The small vitality of the parasites in the nodules of piedra, prevented us from being able to obtain cultures from several of these cases.

We must point out that all the observed cases were perfectly similar, the characteristical nodules around the hair showing always the same appearance: black, hard, very adhering to the hair, of small size and more or less round-shaped. In all our cases, the biggest piedra nodules would show as well in preparations of hair clarified or dissociated by heating in potash at 40 % or in AMMAN lactophenol, likewise in histologic sections, the special formations which were described in 1911 by PARREIRAS HORTA. This latter author found out that the nodules of piedra observed in Brazil included special round-shaped formations, which he named "cysts", each of which contained a few ciliated fusiform spores. The importance of such discovery induced BRUMPT to separate, under the name of *Trichosporum hortai*, the Brazilian from the Columbian form of piedra, the latter being generally known as *Trichosporum giganteum*.

We feel that these last years Columbian piedra has not been investigated enough to be sure that in it there are not the cystic forms such as described by HORTA.

It seems more probable, on the contrary, that the round bright spots which DESENNE, so long ago, described in the Columbian cases, are nothing else but the cysts found and thoroughly described by HORTA in the Brazilian cases.

Such being the case, it will be necessary to find other foundations for distinguishing both species of fungi. A conclusion, however, to be drawn already from the study of the literature on European piedra as also from direct observation of the Brazilian cases is that, clinically and parasitologically, European and Brazilian piedra are to such extent different from each other, that even there cannot be seen any reason to place the respective parasites in just one genus. Cysts, as described by HORTA, have, all of them, the appearance of real asci and even if they could not be identified with such formations, their existence is enough to clearly segregate the parasites of Brazilian piedra into a separate genus.

Of the most recent cases, from which we had material at hand, we isolated the two cultural forms, already known of the parasites of the South American piedra. One, first described by EDUARDO RABELLO, afterwards by PARREIRAS HORTA, gives almost black, dry colonies, covered with aerial hyphae. To this one the name *Trichosporum hortai* created by BRUMPT should be applied. The other one, which JUHEL-RÉNOY described for the first time, produces dry or wet, cerebriform, whitish-yellow colonies. Its appearance turns it rather kindred to European and Asiatic species of the genus *Trichosporum*. The cultures of the latter form have been little studied. It should be emphasized that cultures of both types may be obtained from just one piedra case. This leaves open the question which one of the cultivated fungi is the real agent of the piedra nodules.

In the specimens which develop almost black colonies and correspond to the description of *Trichosporum hortai*, we have just verified an interesting peculiarity. They show in old cultures on carrot, some two months old, fusiform spores, curved, of a greenish-yellow shade, each one with acute ends prolongated by a very thin, filamentous and hyaline appendix, 30 micra in lenght. These spores, which measure 30 micra in length against 10 in width, are identical to those found in the hair nodules in the cases of piedra observed in Brazil. Their presence in the parasitic and cultural forms of the fungus producing piedra, will be used to distinguish a new genus which we establish, proposing it to be named *Piedraia n. g.* The type especies of this new genus will be *Piedraia hortai* (BRUMPT, 1913) if this species is not a synonymous of *Trichosporum giganteum* BEHREND, 1890, the agent of Columbian piedra.

(Mycological Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute
and Laboratory of the Dermatological Clinics
of the School of Medicine, Rio de Janeiro).

Contribuição ao estudo dos aleyrodideos da sub-familia ALEURODICINAE

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

O estudo das thecas pupaes ou pupas (como habitual e impropriamente se as designa) de todas as especies conhecidas de *Aleurodicus*, demonstra que *A. anonae* MORGAN, *A. dugesii* COCKERELL, *A. neglectus* QUAINT. & BAKER, e *A. flumineus* HEMPEL, constituem um grupo perfeitamente distincto das demais que constituem esse genero.

De facto, nessas especies, ha 3 pares posteriores de póros ciriparos abdominaes bem menores que os 4 anteriores, como aliás se observa em outras especies, porem o 5º póro fica situado numa recta traçada do 4º ao 6º.

O *A. anonae*, embora defficientemente descripto pelo autor, de material colhido em *Anona muricata* e em *Richardia pacifica* em Demerara, é considerado a especie typo do genero *Aleurodicus*. A especie descripta por COCKERELL sob o nome de *A. dugesii* é, sem duvida, bem differente de *A. anonae*. O mesmo, entretanto, não se póde dizer com relação ao *A. neglectus*, que, segundo QUAINTANCE e BAKER, differe de *A. anonae* pelo aspecto das azas dos adultos, hyalinas nesta ultima especie e manchadas em *neglectus*. A meu vêr essa differença não tem grande valor taxionomico, pois, nas especies de azas maculadas, alem das manchas variarem na forma e na posição, ás vezes não são muito evidentes ou mesmo desapparecem.

Tenho em mãos preparados de machos e femeas do *flumineus*, uns feitos por HEMPEL e outros por mim, de uma parte do material que serviu a este para descrever essa especie, e se em algumas dessas formas aladas as azas se apresentam evidentemente manchadas, n'outras as manchas são quasi imperceptiveis, havendo mesmo um macho cujas azas são totalmente immaculadas.

Se, pois, é essa a unica differença entre *neglectus* e *anonae*, não me parece razoavel que se as considere especies differentes, mórmente quando se sabe que as pupas de ambos esses aleyrodideos se assestam principalmente em especie de genero *Anona*.

BAKER e MOLES (1), referindo-se ao *Aleurodicus* descripto por HEMPEL sob o nome de *A. flumineus*, suggeriram a possibilidade desta especie sêr identica a *A. neglectus*. D'ahi BONDAR, provavelmente baseado nesta opinião, têr incluido o *A. flumineus* na synonymia de *A. neglectus*.

Entretanto, a julgar pelos desenhos apresentados por QUAINTANCE e BAKER para o *A. neglectus*, não se pode chegar tão facilmente a tal conclusão.

Como disse, possuo topotypos e alguns cotypos do *A. flumineus*, e comparando-os com figura da pupa do *A. neglectus* observei differenças

notaveis, não só no aspecto do orificio vasiforme e orgãos que lhe são annexos, como na disposição dos póros caudaes.

Em *neglectus*, uma linha transversal, tangenciando o bordo posterior do orificio vasiforme, attinge, de cada lado, o penultimo ou 5º póro composto, de modo que o ultimo (6º) fica bem para traz dessa linha. No *flumineus*, em uma serie de exemplares que examinei, os dois ultimos póros estão sempre adiante daquella linha.

Ademais, como se póde vêr na figura que apresento (fig. 1) tanto o orificio vasiforme, como a lingula, são bem differentes nas duas especies.

Emquanto, pois, não me fôr dado examinar especimens typicos de *neglectus*, pelos quaes poderei avaliar melhor as differenças apontadas, continuarei a considerar *A. flumineus* como especie differente de *A. neglectus*, pelo mesmo motivo porque se admitte *neglectus* como especie distincta de *anonae*.

Fig. 1—*Aleurodicus flumineus*.

Ha tempos recebi do eng. agr. J. H. ROEDER uma folha da planta vulgarmente conhecida pelo nome de lixeira (*Curatella americana* L., segundo me informou o botanico GERALDO KUHLMANN), colhida na fazenda Agua Azul, em Monte Alegre (Triangulo Mineiro), apresentando pupas de uma especie de *Aleurodicus*. Infelizmente não as acompanhavam formas adultas.

O alongamento extraordinario dos filamentos cereos que emergem dos 8 grandes póros compostos abdominaes dessas pupas e a disposição destas em series parallelas ao longo das nervuras secundarias, deixando, entre ellas, espaços perfeitamente limpos de cera, bastaria para se distinguir esta bella especie das demais. Dou, entretanto, linhas abaixo, uma descripção detalhada do insecto.

Aleurodicus magnificus n. sp. (figs. 2, 3 e 11)

Pupa: Dorso encoberto por densa secreção cerea, sob a forma de fitas um tanto largas, que se curvam, como petalos de um chrysanthemo, a pouco mais de meio millimetro de altura. Ao redor e formando uma orla de meio millimetro de largura ha uma camada de cêra cotonosa, constituida por filamentos de cêra finissimos e muito unidos. Emergindo da

massa central e oriundos dos 4 pares de grandes póros compostos abdominaes, ha 8 filamentos cereos, cylindricos, vitreos, de 6 centimetros de comprimento, ou mesmo um pouco mais longos, verticalmente dirigidos.

Entre as nymphas, que se assestam ao longo das nervuras secundarias e na pagina inferior da folha, não ha induto cereo revestindo a superficie da folha, como se observa nas folhas infestadas pelo *A. neglectus* e pelo *A. flumineus*.

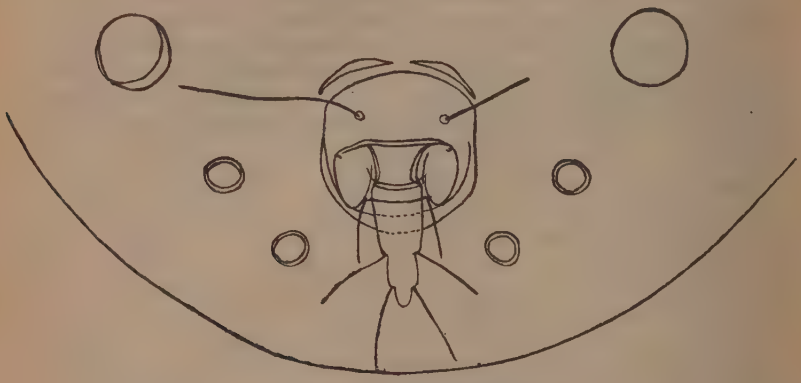


Fig. 2—*Aleurodicus magnificus*.

A côr varia do amarello ao ocraceo. Em todas as preparações a margem se apresenta um pouco dobrada em quasi toda a extensão, porém não como em *Lecanoideus*. Parallelamente ao longo da margem ha uma carreira de póros glandulares muito pequenos e contiguos. Para dentro, 3 carreiras de póros bem maiores, de contorno sub-circular, divididos ao meio por um tenue septo, ao longo do menor eixo. Na zona submarginal em que se acham estes póros ha, entre elles, pequenos póros simples circulares. Finalmente, no dorso, vêm-se tambem numerosos póros simples circulares, maiores que os pequenos da zona submarginal, porém menores que os póros septados dessa zona, excepto os que se acham entre os 4 póros compostos caudaes, que se apresentam pouco mais ou menos tão calibrosos como os póros septados.

Ha 7 pares de póros compostos. Os 4 pares abdominaes, os maiores (0,055 mm.), são iguaes. Os do par anterior ou cephalico, embora apresentando estructura identica a daquelles, são de menor diametro (0,045 mm.). Os 2 pares caudaes são subiguaes, porém bem menores que os outros e de estructura differente.

Além de algumas cerdas thoraxicas e do par situado adiante do orificio vasiforme, ha, ao redor do corpo e implantadas na zona submarginal, 11 cerdas de cada lado, sendo as dos 2 pares caudaes as mais robustas. Entre a penultima e a ultima caudaes ha ainda uma cerda de cada lado, inserida na face ventral porém menos robusta que aquellas.

Os caracteres do orificio vasiforme e dos orgãos que lhe são annexos podem sêr observados nas figuras 2 e 3.

Comprimento: 1,3 mm., largura: 1,02 mm.

Cotypos: preparados ns. 266, 267 e 332 da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

Revendo uma pequena collecção de pupas de aleyrodideos, que montei em laminas quando trabalhava no Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal do Instituto Biologico de Defesa Agricola, encontrei varias especies interessantes que estudarei nas linhas a seguir.

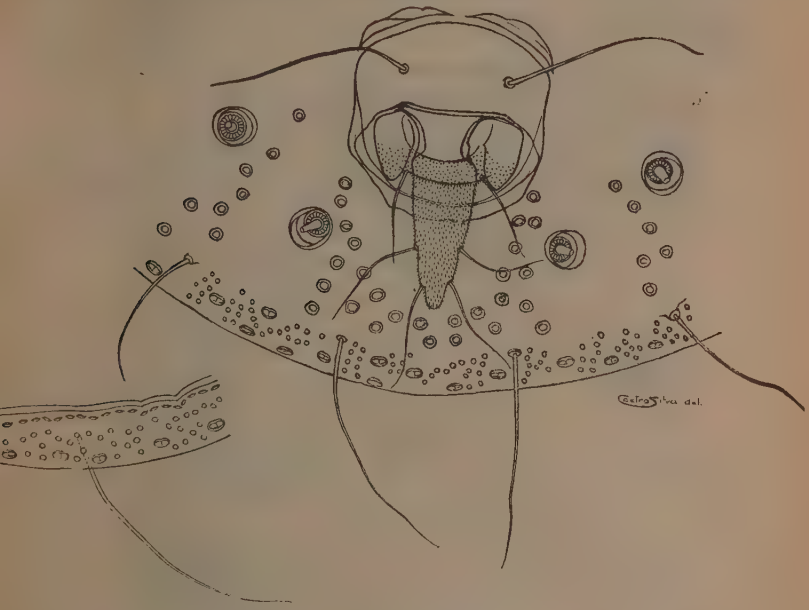


Fig. 3 – *Aleurodicus magnificus.*

Assignalo em primeiro lugar uma especie de *Aleurodicus*, que apanhei em 1921 sobre folhas de laranjeira na chacara do Sr. ARLINDO GUIMARÃES, em S. Lourenço (Sul de Minas).

Infelizmente nem todos os 6 exemplares desta especie, montados em 2 laminas, estão bem conservados, pois tinham sido invadidos pelo mycelio de um fungo entomophyto. Todavia em alguns ainda podem sêr perfeitamente observados os principaes detalhes estructuraes e, por elles, verifiquei que as pupas em questão pertencem a uma nova especie que aqui descreverei.

Aleurodicus Bondari n. sp. (fig. 4)

Os exemplares colhidos não apresentavam secreção cerea, provavelmente por terem sido parasitados.

Parte anterior do corpo mais attenuada que a posterior. Não se notam póros simples, nem na peripheria, nem na parte central. Vêm-se bem 7 pares de póros compostos, porém, quasi todos, de estructura differente.

Os 3 pares abdominaes anteriores são iguaes e relativamente grandes. Os 2 póros cephalicos são, pouco mais ou menos, de calibre igual ao

daquelles, porém de estructura bem differente, sendo esta entretanto identica a dos póros do 4º par abdominal. Estes, não só são um pouco menos calibrosos que os dos 4 pares anteriores, como se acham situados um pouco para fóra da posição em que geralmente se os encontra nas outras especies de *Aleurodicus*.

Os dois pares caudaes são bem menores que os demais e iguaes entre si.

Os caracteres do orificio vasiforme e dos orgãos appensos ao mesmo pódem ser apreciados na figura 4.

Comprimento: 1,15 mm., largura: 0,20 mm.

Cotypos: preparados ns. 1 e 2, ha pouco mencionados.

Dedico esta especie ao meu collega e amigo GREGORIO BONDAR pelo muito que fez para o conhecimento dos aleyrodideos do Brasil.

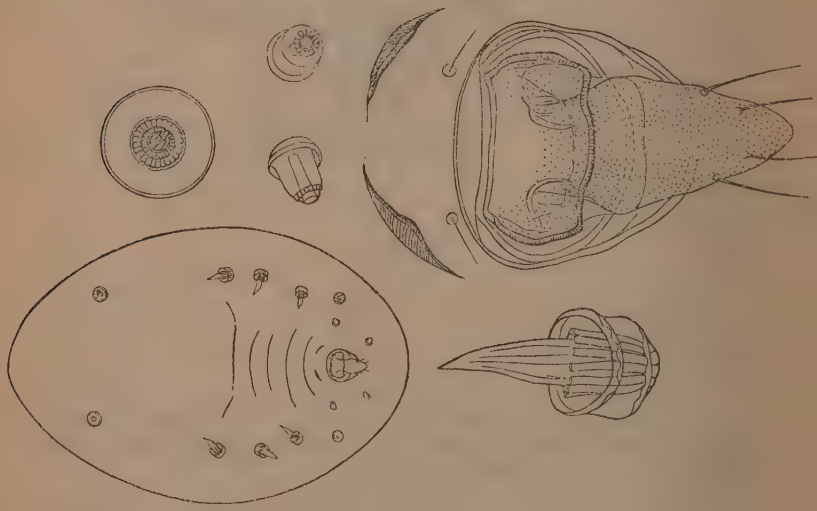


Fig. 4—*Aleurodicus Bondari*.

Ainda na referida collecção tive o ensejo de determinar mais as seguintes especies da subfamilia Aleurodicinae.

Aleurodicus flavus HEMPEL

HEMPEL (5), p. 4.
« (6), p. 1922.
BONDAR (2), p. 68.

Prep.: 246, 247, 299, 300, 304 e 305 (Serv. Vig. Sanit. Veget.). Material colhido em uma planta sylvestre, em Pinheiro (E. do Rio) e em folhas de *Begonia*, no Horto Botanico de Nictheroy.

Na collecção do Instituto Oswaldo Cruz ha tambem 5 pupas desta especie montadas na prep. n. 345.

Aleurodicus cocois (CURTIS)

QUAINTANCE & BAKER (7), p. 47.

1 exemplar, juntamente com outro de *A. maritimus*, no preparado n. 343 (Serv. Vig. Sanit. Veget.).

Material colhido em folhas de oiti (*Moquilea tomentosa*), Praia de Botafogo (Rio).

Aleurodicus pulvinatus (MASKELL)

QUAINTANCE & BAKER (7), p. 66.

Varios exemplares nos preparados ns. 203 e 341 (Serv. Vig. Sanit. Veget.).

Material em folhas de uma planta sylvestre do Horto Botanico de Nictheroy e de oiti (*Moquilea tomentosa*), Rio de Janeiro.

Aleurodicus maritimus HEMPEL

(= *Aleurodicus linguosus* BONDAR)

HEMPEL (6), p. 1123.
BONDAR (2), p. 76.

Trata-se de uma especie bem caracteristica, não só pelo aspecto e disposição dos póros glandulares, como pelo extraordinario alongamento da lingula, cuja extremidade, em geral, excede o bordo posterior da pupa. Em alguns especimens, entretanto, ella mal attinge esse bordo.

Os exemplares que examinei estão montados nas laminas 245, 313, 342 e 343 (Serv. Vig. Sanit. Veget.) e foram retirados de folhas de uma planta sylvestre de Nictheroy, de guando (*Cajanus indicus*), Nictheroy e de oiti (*Moquilea tomentosa*), Praia de Botafogo (Rio).

Lecanoideus giganteus QUAINTANCE & BAKER

QUAINTANCE & BAKER (7), p. 70.

Varios exemplares nas laminas 214, 222 e 223 (Serv. Vig. Sanit. Veget.), colhidos em folhas de *Rollinia orthopetala* (biribá), remettidas do Pará (na collecção do Instituto Oswaldo Cruz ha tambem material desta especie na lamina n. 334, colhido em Pernambuco pelo Eng. Agr. ULYSSES CAVALCANTE DE MELLO sobre uma planta não determinada.

Leonardius lahillei (LEONARDI)

(? = *Leonardius loranthi* BONDAR)

QUAINTANCE & BAKER (7), p. 33.
BONDAR (2), p. 42 e 44.

Esta especie é commumente encontrada no Rio de Janeiro, no E. do Rio e em S. Paulo sobre folhas de herva de passarinho (*Loranthaceae*).

Os primeiros exemplares que examinei foram apanhados em 1917 sobre herva de passarinho em Pinheiro (E. do Rio).

Mais tarde remetti alguns exemplares a QUAINTANCE que confirmou a minha determinação.

Na margem da pupa ha uma carreira submarginal de papillas bem visiveis e, para dentro, mais duas outras porém não tão evidentes. No apice do orificio vasiforme ha um póro circular no qual se insere um appendice espiniforme, que, em algnns exemplares, se destaca, ficando apenas o referido póro como se nota na fig. 8*c* apresentada por BONDAR para o seu *Leonardius loranthi*.

Desta especie ha muitos especimens de pupas montadas em balsamo nas collecções do Gabinete de Entomologia da Escola Superior de Agricultura, do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal e do Instituto Oswaldo Cruz.

Bakerius phrygilanthi BONDAR

BONDAR (2), p. 35.

Alguns exemplares nas prep. 479, 480, 481 e 512 (Serv. Vig. Sanit. Veget.).

Material colhido em folhas de herva de passarinho (*Loranthaceae*), Santa Cruz (Rio de Janeiro).

Paraleyrodes goyabae (GOELDI) (fig. 12)

BAKER & MOLES (1), p. 624.
BONDAR (2), p. 93.

Examinei varias pupas, que parecem ser desta especie, colhidas em folhas de goyabeira (*Psidium guajava*), de amoreira (*Morus* sp.) e de sapotiseiro (*Achras sapota*). Acham-se montadas nas preparações 291, 314 e 315 (Serv. Vig. Sanit. Veget.).

? **Paraleyrodes singularis** BONDAR (fig. 5)

No preparado n. 509 da collecção do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal encontra-se uma pupa de *Paraleyrodes* cujos caracteres, até certo ponto, correspondem á descripção dada por BONDAR para a pupa do *P. singularis*. Sendo, porém, esta descripção defficiente, vejo-me impossibilitado de dizer se o exemplar por mim examinado pertence ou não á especie classificada por BONDAR. Dahi apresentar a descripção e algumas figuras do exemplar em questão, as quaes, no caso de se tratar realmente do *singularis*, serão mais que sufficientes para o reconhecimento dessa especie.

Ha 7 pares de grandes póros compostos: 1 cephalico, 2 abdominaes anteriores pequenos e 4 abdominaes posteriores grandes. Estes iguaes aos cephalicos, os anteriores bem menores que os cephalicos e de estructura differente (no exemplar unico que examinei ha, de um lado, 4 grandes póros abdominaes e 2 pequenos e do outro 3 grandes e 3 pequenos). Para os caracteres desses póros e do orificio vesiforme v. figura 5.

Comprimento: 0,63 mm., largura: 0,44 mm.

Material de folhas de jaboticabeira (*Myrcia jaboticaba*), colhidas pelo Snr. ARNALDO G. MACIEL em Villa Izabel (Rio de Janeiro).

Tratarei em seguida de mais duas especies de *Paraleyrodes*, aliás muito semelhantes entre si, que differem das demais descriptas do Brasil, pelo aspecto dos grandes póros ciriparos, cujo diametro vae gradativamente diminuindo do cephalico ao 4º abdominal.

Como as microphotographias e desenhos que apresento são mais que sufficientes para caracterisação de ambas assignalarei apenas os principaes detalhes morphologicos.

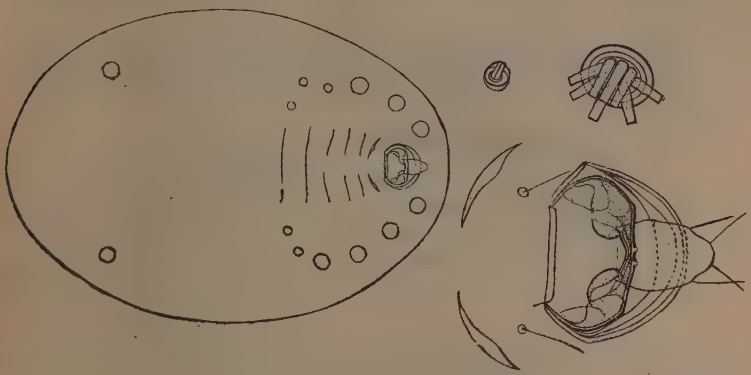


Fig.—5 *(?) Paraleyrodes singularis.*

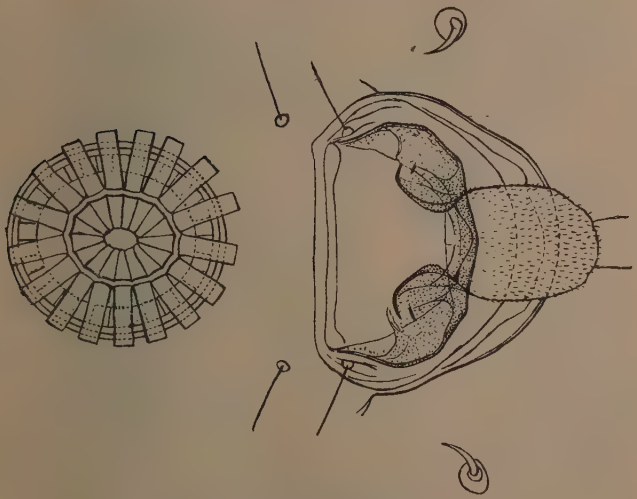


Fig. 6—*(?) Paraleyrodes pulverans.*

? **Paraleyrodes pulverans** BONDAR (figs. 6 e 3)

Comprimento: 0,71 mm., largura: 0,48.

Encontrei as pupas desta especie sobre folha de carrapeteira (*Guarea trichilioides*) na Quinta da Boa Vista. Ao examinal-as tive a impressão

de se tratar do *Paraleyrodes pulverans* BONDAR, pois a descripção das pupas desta especie está mais ou menos de accôrdo com os caracteres observados nos nossos especimens. Todavia BONDAR diz que em *pulverans* os grandes póros ciriparos são iguaes, o que não se observa nas pupas por mim estudadas, cujos póros são desiguaes.

Nesta especie os póros cephalicos, ás vezes, são um pouco maiores que os do 1º par abdominal; apresentam, em geral, 17 ou 18 bastonetes. Os abdominaes anteriores têm 16 ou 17 e os 2 caudaes 12 ou 13 bastonetes.

Material contido nas preparações ns: 41 do Gabinete de Entomologia da Esc. Sup. de Agric. e Med. Veter., 248 e 249 do Serviço Vigilancia Sanitaria Vegetal e 351 do Instituto Oswaldo Cruz.

Paraleyrodes citricolus n. sp. (fig. 7)

Esta especie é muito proxima da precedente, differe, porém, não só pelos caracteres do orificio vasiforme, como pelo aspecto dos grandes póros ciriparos. Os póros cephalicos são um pouco menores que os do 1º par abdominal; aquelles apresentam 23 a 24 placas ou bastonetes e estes 25 ou 27. Os do 2º e 3º pares possuem 21 placas e os do 4º, 15 ou 19 placas.

Holotypo: uma pupa montada na lamina n. 510 do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal. Encontrada pelo Snr. ARNALDO GOMES MACIEL sobre folhas de laranjeira (*Citrus aurantium*).

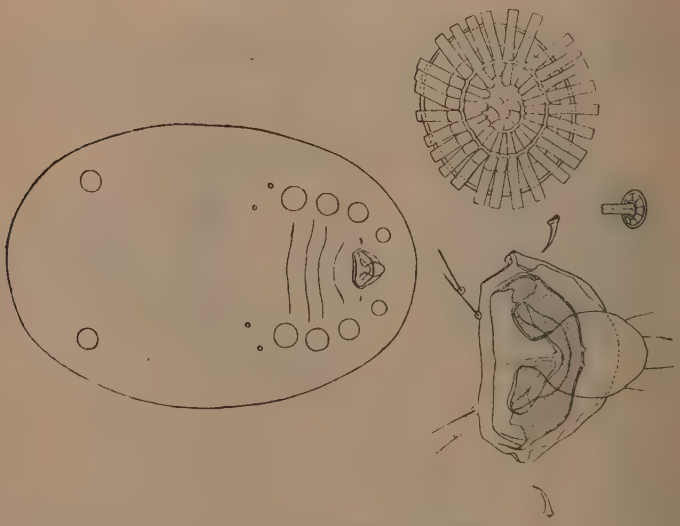


Fig. 7—*Paraleyrodes citricolus.*

Antes de concluir a presente nota devo ainda descrever dois aleurodicineos pertencentes ao genero *Ceraleurodicus* HEMP. Um delles encontrei em folhas de *Nectandra* sp., apanhadas em Therezopolis e cedidas para

exame pelo Dr. FIGUEIREDO DE VASCONCELLOS. Trata-se evidentemente de uma nova especie do genero *Ceraleurodicus*, a qual dou o nome de *C. Hempeli*, em homenagem a ADOLPH HEMPEL., pelos seus notaveis trabalhos sobre os nossos aleyrodideos. Antes, porem, de mencionar os principaes caracteres desta especie, devo fazer algumas considerações sobre o genero *Ceraleurodicus* e especies que o constituem.

HEMPEL, ao descrever esse genero, fel-o exclusivamente baseado em material que lhe foi enviado por BONDAR. Pelo que se lê no trabalho deste ultimo pesquizador, acompanhavam as pupas, que serviram para diagnose do genero *Ceraleurodicus* e da especie genotypo *C. splendidus*, formas adultas de uma outra especie, provavelmente pertencente a um outro genero (BONDAR). Dahi HEMPEL, ao caracterisar esse genero, ter descripto a pupa de um insecto e o adulto de outro. Como, porem, os aleyrodideos, em geral, são mais facilmente reconhecidos pela morphologia pupal e como HEMPEL apresentou em primeiro lugar a descripção exacta da pupa de uma especie, incontestavelmente nova (*splendidus*), typo de um genero tambem novo (*Ceraleurodicus*), o facto de ter descripto formas adultas que não pertencem a pupa por elle estudada, não invalida o genero por elle creado para essa forma especial de pupa, tanto mais quanto a especie typo do mesmo se encontra no material n. 20.544, guardado na collecção do Museu Paulista.

Tempos depois BONDAR descreveu pupas identicas como pertencentes a uma nova especie (*cinereus*) e creou tambem um novo genero *Radialeurodicus* para as mesmas, descrevendo então as respectivas formas adultas. Ora, de accôrdo com o estatuido no art. 27 das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica, embora BONDAR tenha apresentado uma descripção exacta do insecto nas suas principaes formas de desenvolvimento, emendando assim a diagnose apresentada por HEMPEL relativamente ás formas adultas, os novos nomes que apresentou não podem deixar de entrar na synonymia de *Ceraleurodicus*.

Pelas mesmas razões devem ser incluidas na synonymia de *Octaleurodicus nitidus* HEMP., *Aleuronudus induratus* HEMP. e *Pseudaleurodicus bahiensis* HEMP., respectivamente, os seguintes generos e especies, novamente descriptos por BONDAR, *Quaintancius rubrus*, *Pentaleurodicus induratus* e *Pentaleurodicus bahiensis*.

Aliás, o estudo comparado das especies que deviam ser incluidas no genero *Octaleurodicus* (=*Quaintancius*) como as do genero *Ceraleurodicus* (=*Radialeurodicus*), fez-me convicto de que todas constituem um grupo generico unico, quiçá bem homogeneo, não somente pelo aspecto geral das pupas e estructura dos póros ciriparos, como pela configuração das azas, especialmente as anteriores, que apresentam uma reintrancia, mais ou menos evidente, no bordo posterior, ao nivel do apice da media (*M*). D'ahi julgar que *Octaleurodicus nitidus* HEMP. (=*Quaintancius rubrus* BOND.) e *Quaintancius pulcherrimus* (QUAINT. & BAKER) BOND., devem ser incluidos no genero *Ceraleurodicus*.

Fica, pois, este genero constituido pelas seguintes especies: *splendidus* HEMP. (genotypo), *octifer* (BOND.), *assymetrus* (BOND.), *nitidus* (HEMP.) e *pulcherrimus* (QUAINT. & BAKER.).

Ceraleurodicus hempeli n. sp. (figs. 8 e 14)

A especie que vou considerar é bem differente das demais por apresentar apenas um par de póros ciriparos compostos, aliás muito reduzidos, ao nivel do bordo anterior do 3º segmento abdominal. Immediatamente adiante de cada um desses póros, ha alguns póros simples muito pequenos. Na face ventral desse mesmo segmento, porem para fóra do ponto em que se acham os póros glandulares ha pouco referidos e para tráz do apice dos tarsos posteriores, ha um curto appendice, provido de um gancho apical, mais robusto que o gancho tarsal. Taes appendices são tambem encontrados em pupas de outros aleurodicineos, que podem tambem apresentar um outro par de identicos appendices aos lados do orificio vasiforme.

Cerdas finas, de apice um tanto dilatado, dispostas da seguinte forma: 4 pares no meio do corpo (sendo 1 par cephalico e um ao nivel de cada um dos segmentos thoraxicos) e 15 pares de cada lado do eixo longitudinal, ao longo da zona marginal, ora nos raios chitinisados, ora no espaço entre elles.

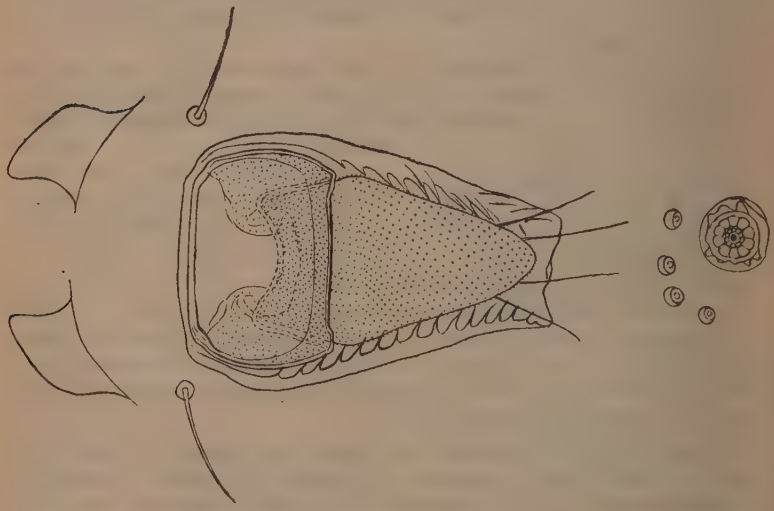


Fig. 8—*Ceraleurodicus Hempeli.*

A margem do corpo é finamente denteada e reforçada de uma carreira de dentes, dentro da qual ha pequenos póros ciriparos que formam uma fileira submarginal continua ao redor do corpo.

O orificio vasiforme e a lingula acham-se bem representados na figura 8.

Comprimento: 2,40 mm., largura: 1,60 mm.

Cotypos: 2 exemplares montados na lamina n. 503 da collecção do Instituto Oswaldo Cruz.

Ceraleurodicus Moreirai n. sp. (figs. 9, 15 e 16)

O outro aleurodicineo, a que ha pouco me referi, é representado por algumas pupas montadas nas laminas 380 e 381 da collecção do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal, retiradas de folhas de fructa de conde (*Anona squamosa*), apanhadas n'uma chacara do Rio de Janeiro pelo Eng. Agron. A. F. MAGARINOS TORRES.

Para esta nova especie de *Ceraleurodicus* dei o nome *Moreirai*, em homenagem ao meu presado amigo e collega CARLOS MOREIRA, Director do Instituto Biologico de Defesa Agricola, que muito tem contribuido em pról da entomologia agricola brasileira.

Pelo aspecto geral da pupa, verifica-se que o insecto tem grandes affinidades com as especies descriptas por BONDAR sob os nomes—*Radialeurodicus octifer* e *R. bakeri*.

Nas pupas ha 3 pares de póros ciriparos maiores, um na parte anterior do corpo, um no meio e outro na parte posterior. Além destes ha outros menores: 1 de cada lado da linha mediana, no meio de cada uma das grandes manchas escuras do abdomen, e um ainda menor que os precedentes, na base de cada um dos ramos da mancha arqueada posterior. Além das cerdas que ornam a margem da pupa ha 4 pares de cerdas identicas: 1 ao nivel da região cephalica e 3 nos segmentos thoraxicos.

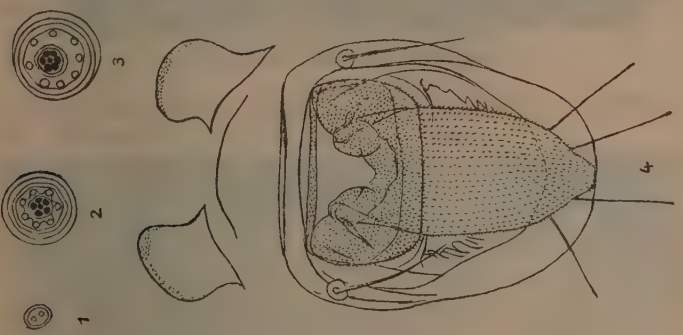


Fig. 9—*Ceraleurodicus Moreirai*.

1—Póro menor situado na mancha escura arqueada posterior.
2— « « « grande mancha escura posterior.
3—Um dos 6 grandes póros.
4—Orificio vasiforme.

Nota-se em toda a superficie do corpo grande numero de pequenos póros ciriparos apresentando um ou mais orifícios.

Comprimento: 1,60 mm., largura: 0,90 mm.

O aspecto das glandulas, do orificio vasiforme da pupa, das azas anteriores nos adultos dos 2 sexos e da porção apical do abdomen do macho, pode ser apreciado nas figuras e photomicrographias.

Holotypo: a pupa perfeita montada na lamina n. 380 (Serv. Vig. Sanit. Veget.).

Paratypos: exemplares montados na lamina 381.

Ao terminar este trabalho devo consignar os meus agradecimentos aos Snrs.: CASTRO SILVA, que fez os desenhos aqui figurados, J. PINTO, que tirou a maior parte das photomicrographias, Dr. CEZAR PINTO, que mandou tirar a photographia do *Aleurodicus flumineus* pelo Snr. FEDERMANN e SANTOS LAHERA, que é o autor da photographia do *Aleurodicus magnificus*.

Manguinhos, Novembro de 1928.

BIBLIOGRAPHIA

(1) BAKER, A. C. & MOLES, M. L.—The Aleyrodidae of South America, with description of four new chilean species. Rev. Chil. de Hist. Nat., 1921, XXV, 609-656.

(2) BONDAR, G.—Aleyrodideos do Brasil. Publ. da Secretaria da Agricultura, Industria e Obras Publicas do Estado da Bahia. Secção de Pathologia Vegetal, 1923, 182 pgs., 84 figs.

(3) GOELDI, A.—Neue brasilianische Aleurodes—Arten. Mittheil. schweizent. Ges., 1886, 7, 6, 241-250.

(4) HEMPEL, A.—Descripção de uma nova especie de aleurodidae. Rev. Mus. Paul., 1918, X, 211-214, 1 fig.

(5) HEMPEL, A.—Algumas especies novas de hemipteros da familia Aleyrodidae. Notas preliminares editadas pela redação da Revista do Museu Paulista, 1922, vol. 2, fasc. 1º, 15 março, 10 pp.

(6) HEMPEL, A.—Hemipteros novos ou pouco conhecidos da familia Aleyrodidae. Rev. Mus. Paul., 1922, XIII, pp. 1121-1157.

(7) QUAINTANCE, A. L. & BAKER, A. C.—Classification of the Aleyrodidae. U. S. Dept. Agric. Tech. Ser. 27, t. 1, 1913, 93 pp., XXIV ests.

Fig. 10—*Aleurodicus flumineus* (um pouco reduzida).

Fig. 11—*Aleurodicus magnificus* (um pouco reduzida).

Fig. 12—*Paraleyrodes goyabae.*

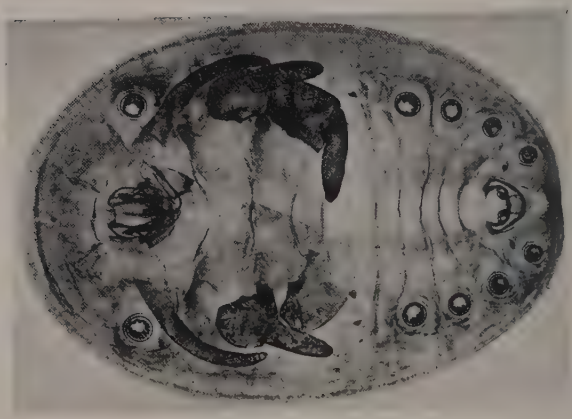


Fig. 13—*Paraleyrodes pulverans.*

Fig. 14 -*Ceraleurodicus Hempeli.*

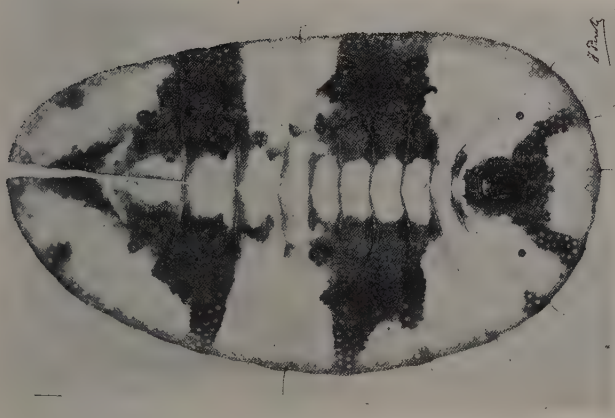
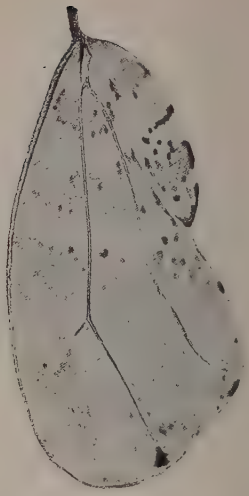


Fig. 15—*Ceraleurodicus Moreirai.*

1



2

3

Fig. 16—*Ceraleurodicus Moreirai.*

1—Aza anterior do macho.
2— « « da femea.
3—Genitalia do macho.

Estudos sobre a lepra

II. TENTATIVAS DE CULTURA DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* (*COCCOTHRIX LEPRAE* LUTZ, 1886). ISOLAMENTO DE UM ACTINOMYCES DE UM LEPROMA. O *ACTINOMYCES LEPROMATIS*, n. sp.

(Nota prévia com 11 figuras)

Pelo Dr. H. C. de SOUZA-ARAUJO.

Depois de varias tentativas infructiferas para cultivar o bacillo da lepra, consegui isolar, de leproma, um actinomyces a que dei o nome de *Actinomyces lepromatis*.

Extirpando, por enucleação, lepromas floridos da doente H. S., que o Dr. OSWINO PENNA teve a bondade de me recommendar, utilizei-os para inoculações e semeaduras.

Os meios semeados com emulsão de bacillos permaneceram apparentemente estereis até o 15º dia, quando o caldo glycerinado começou a mostrar ligeiro grumo, no fundo do tubo, sem turvação do meio, o mesmo acontecendo, muitos dias após, com o caldo simples. Esfregaços desse material, colhido no fundo do tubo, com pipeta, e corados pelo ZIEHL-NEELSEN revelaram uma cultura mixta de bacillos acido-alcool-resistentes e filamentos, ramificados alternadamente, impregnados pelo corante de fundo. Subculturas em agar, caldo e batata, glycerinados a 5 %, revelaram, ao microscopio, menor quantidade de bacillos e maior riqueza de filamentos.

Culturas subsequentes apresentaram apenas filamentos com os caracteres typicos de um actinomyces, que estudei em collaboração com o Dr. OLYMPIO da FONSECA filho, chefe da Secção de Mycologia do Instituto Oswaldo Cruz.

No mesmo dia em que semeei emulsão, depositei, sobre agar glycerinado, fragmentos de lepromas da mesma procedencia, nos quaes o bacillo de HANSEN se multiplicou, sem, comtudo, se adaptar ao meio, resultando negativas as repicagens.

Esfregaços desse tecido leproso, depois de 60 e até 120 dias, revelaram grande abundancia de bacillos acido-resistentes, sem nenhum outro germen. Já verifiquei este facto com material de quatro doentes, e isto é uma repetição dos resultados das pesquizas de NEISSER, BE'ZANÇON, EMILE-WEIL e CHARLES NICOLLE, dentre os antigos. Modernamente HERMANN de SCHROETTER, de Vienna, semeando emulsão de leproma em meios com sôro de leproso, e SUSVIELA GUARCH, de Montevidéo, cultivando lepromas em meio de CARREL para tecidos, obtiveram a proliferação do bacillo de HANSEN, sem obter subculturas. O que vi no Japão, nos laboratorios de HARADA e de KUJO (Osaka) é mais significativo: os fragmentos de lepromas servem de alimento natural aos bacil-

los, que, se multiplicando sempre, chegam a se adaptar ao meio artificial, dando subculturas pathogenicas para os animaes de laboratorio.

O *A. lepromatis* desenvolve-se bem tanto nos meios solidos communs como nos meios liquidos. Não se multiplica, ou se multiplica mal, nos meios de SABOURAUD e não funde a gelatina. Só coagulou o leite depois do 15º dia. E' no agar simples que produz os aspectos mais typicos, porém no agar glycerinado produz colonias mais exhuberantes, de côr amarello-alaranjada. O cogumelo produz nestes dous meios colonias com sulcos radiados, e forte pigmentação. Tanto no agar como na batata glycerinados reveste-se duma camada branca, cretacea, caracteristica da esporulação dos actinomycetos. As culturas são fortemente adherentes ao substractum. No agar com manteiga e com oleo de olivas, aconselhados por LIESKE, em poucos dias forma-se uma camada lusidia que cobre todo o meio. Ahi a pigmentação é menos accentuada e a cultura menos chromogenea, produzindo, ás vezes, formas bacillares acido-alcool-resistentes. Nos meios de LOEFFLER e de PETROFF produz colonias grandes, cerebriformes, de cor amarella-viva.

Desenvolve-se bem nos caldos simples e glycerinado, na agua peptonada, formando colonias globosas, no fundo do tubo, sem turvar o meio, mas pigmentando-o fortemente.

Ao exame microscopico o cogumelo apresenta a morphologia caracteristica dum actinomyces do 1º typo: thallo rudimentar com ramificações verdadeiras, em direcções alternadas, não bacilliformes. E' GRAM-positivo e não acido-resistente, como a maioria dos actinomyces. Esfregaços da camada cretacea de esporulação mostram esporos coccoides, ligeiramente alongados, GRAM-positivos. Esfregaços de culturas em agar-manteiga e agar-oleo de olivas, mostram mycelios degenerados, não acido-resistentes e filamentos e bastonetes acido-resistentes, propriedade esta que poderá ser mantida com maior numero de passagens em meios gordurosos. Proseguiremos nos estudos biologicos e experimentaes do cogumelo ora descripto.

CONCLUSÕES:

1. Não sei, ainda, que relação tem o *Actinomyces lepromatis* com a lepra. O seu isolamento é a repetição, em parte, dos resultados das pesquizas de DEYCKE e RESCHAD, WILLIAMS, ROST, KEDROWSKI, HERMAMN de SCHROETTER, e outros.

2. O Prof. W. J. KEDROWSKI, de Moscou, após longos annos de estudos, chegou á conclusão de que os bacillos da lepra e da tuberculose pertencem a um grupo de actinomycetos.

3. Recentemente KEDROWSKI, BRULOWA, PLATONOV, etc., conseguiram mutações de culturas velhas de bacillos da lepra e da tuberculose em actinomyces.

4. Culturas de *Actinomyces lepromatis* produziram, em meios gordurosos, formas bacillares acido-alcool-resistentes.

NOTA—Trabalho apresentado á Sociedade Brasileira de Biologia, em 31—10—928.

Fig. 1

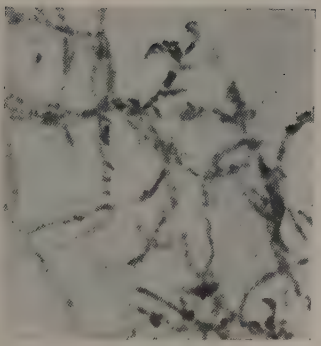


Fig. 2

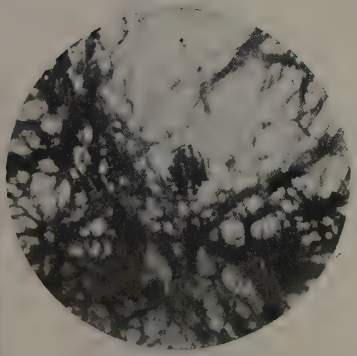


Fig. 3

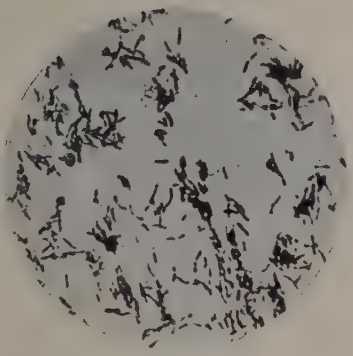


Fig. 4

Fig. 1. A doente H. S. que forneceu material para as culturas (lepromas *a* e *b*). Fig. 2. Cultura mixta: bacillos acido-resistentes e filamentos. Fig. 3. Uma globia entre os mycelios do *Actinomyces lepromatis*. Fig. 4. Esfregaço da cultura de leproma em agar glycerinado (105 dias): só bacillos acido-resistentes.

Fig. 1. The patient H. S. who provided material for the cultures (lepromata *a* & *b*). Fig. 2. Mixed culture: acid-fast bacilli and filaments. Fig. 3. A "globie" among the mycelia of the *Actinomyces lepromatis*. Fig. 4. A scraping of a leproma culture in glycerine agar (105 days): acid-fast bacilli only.

Photos J. Pinto

a b c

Fig. 5

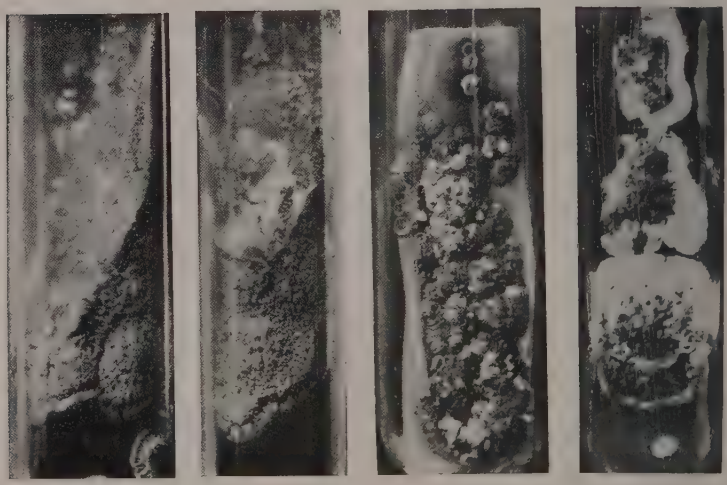


Fig. 6

a b

Fig. 7

Fig. 5. (a) Cultura do *Actinomyces lepromatis*, de 60 dias, em agar simples. Culturas em agar glycerinado, de 17 dias (b) e de 60 dias (c). Fig. 6. Culturas em agar glycerinado, de 75 dias. Fig. 7. Culturas de 10 dias em batata glycerinada (a) e de 60 dias em agar glycerinado (b), coberta duma camada branca, cretacea, de esporulação.

Fig. 5. (a) A 60 days' culture of *Actinomyces lepromatis* in plain agar, 17 (b) and 60 days' (c) cultures in glycerine agar Fig. 6. Cultures in glycerine agar old 75 days. Fig. 7. Culture of 10 days in glycerine potato (a) and 60 days in glycerine agar (b) covered with a white cretaceous coating of sporulation.

Photos J. Pinto

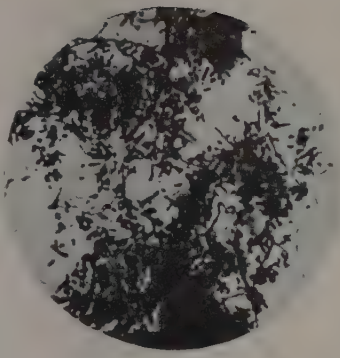


Fig. 8

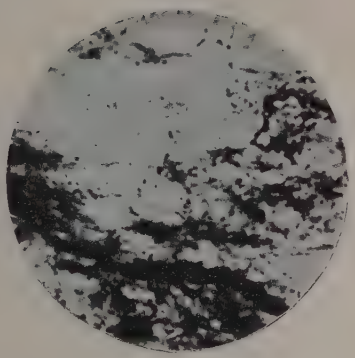


Fig. 9

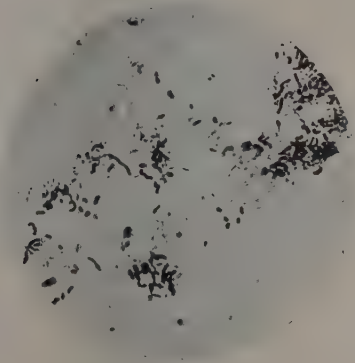


Fig. 10

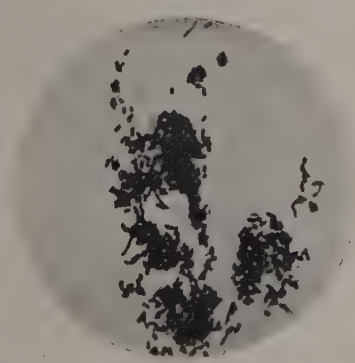


Fig. 11

Fig. 8. Esporos do *A. lepromatis* de cultura de 17 dias em agar glycerinado. Fig. 9 Cultura em agar manteiga de 22 dias (2ª geração) : mycelios em degeneração. Figs. 10 e 11. Esfregaços da mesma cultura em agar manteiga mostrando filamentos e bacillos acido-alcool-resistentes.

Fig. 8. Spores of *A lepromatis* of a 17 days culture in glycerine agar. Fig. 9. Culture in agar butter with 22 days, [2nd geration]: mycelia in degeneration. Figs. 10 and 11. Scrapings of the same culture in agar butter showing filaments and acid-alcohol-fast baciiii.

Photos J Pinto

Studies upon Leprosy

II. ATTEMPTS TO CULTIVATE THE *MYCOBACTERIUM LEPRAE (COCCOTHRIX LEPRAE* LUTZ, 1886). ISOLATING AN ACTINOMYCES FROM A LEPROMA. THE *ACTINOMYCES LEPROMATIS*, n. sp.

(Preliminary note with II figures).

By H. C. de SOUZA-ARAUJO, M. D., Dr. P. H.

After several unfruitful attempts with a view to cultivate the bacillus of leprosy, I succeeded to isolate, from leproma, an actinomyces which I named as *Actinomyces lepromatis*.

After extirpating, without the skin, some flourished lepromata from the female patient H. S., whom Dr. OSWINO PENNA had the kindness to recommend to me, I used them in inoculations of animals and of culture media.

The mediums sown with emulsion of bacilli remained sterile in appearance up to the 15th day, when then the glycerine broth began to show slight clots in the bottom of the tube, the medium not showing the least cloudy. The same happened, many days afterwards, with plain broth. Smears of this material, being collected from the bottom of the tube by means of a pipet, and stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed a mixed culture of acid-fast bacilli and filaments alternately ramified, not acid-fast. Subcultures in agar, broth and potato, glycerinated at 5 %, revealed microscopically a lesser quantity of bacilli against which a brighter riches in filaments.

Subsequent cultures gave only filaments, with typical characteristic of an actinomyces, which I studied in collaboration with Dr. OLYMPIO da FONSECA Junior, head of the section of Mycology, Oswaldo Cruz Institute.

On the same day I had inoculated the emulsion, I deposited, on glycerine-agar, fragments of lepromas of the same origin, in which the HANSEN's bacillus multiplied without however adapting to the medium, the results of whose replanting remained thus negatives.

Scrapings made from that leprotic tissue after 60, up even to 120 days, and stained by ZIEHL-NEELSEN revealed a big quantity of acid-fast bacilli without the presence of any other germ. I had already obtained the same results with material from four patients, this being a renewal of the results of researches of NEISSER, BE'ZANÇON, EMILE-WEIL and CHARLES NICOLLE, among the ancient. More recently, HERMANN de SCHROETTER, of Vienna, smearing emulsion of leproma on medium with leper's serum, and SUSVIELA GUARCH, of Montevideo, in cultivating lepromas in the CARREL's medium for tissues, obtained the proliferation of the HANSEN's bacillus without succeeding in getting subcultures. What I have seen in Japan, in the HARADA and KUJO (Osaka) laboratories is by far more notheworthy: the fragments of the lepromas are the natural

food of the bacilli, which still multiplying themselves, happen to get fit to adaptation to the artificial medium, giving subcultures, pathogenic to laboratory animals.

The *A. lepromatis* develops well, either in common solid or in fluid mediums. It doesnot or hardly grow in the SABOURAUD's mediums and does not liquefy gelatine. Milk not clotted till the 15th day. The most typical aspects are found in plain agar; in glycerine-agar, however, it produces colonies, more luxuriant, of an orange yellow shade. The fungus produces in both media colonies with radiating furrows, darkening the media. As well in glycerinated agar as in potato, it gets covered with a white, cretaceous coating, characteristical of sporulation of actinomyces. The cultures are strongly adherent to the substratum. In agar-butter and agar-olive oil, which mediums are advised by LIESKE, after a few days a bright and plain surface is formed, which covers the whole medium. The pigmentation is there less accentuated and the culture less chromogenic. There appear sometimes bacillary forms of acid-alcool fast character. In LOEFFLER's and PETROFF's mediums, there is a formation of large, cerebriform colonies of a bright yellow color.

It develops well in plain and glycerinated broths, in peptonized water, forming globulous colonies in the bottom of the tube, without the medium getting turbid, the same however appearing strongly pigmented in brown.

On microscopical examination, this fungus shows the characteristical morphology of an actinomyces of the first type: rudimentary thallus with real alternating ramifications, not bacilliform. It is GRAM-positive, and non acid-fast like most of the actinomyces. Scrapings made from the cretaceous coating of sporulation show roundish or oval spores, slightly lengthened, GRAM-positive. Scrapings made from cultures in agar-butter and agar-olive oil show degenerated mycelia, not acid-fast, and filaments and bacilli acid-fast which property may be kept through more numerous passages in greasy mediums. We shall continue our biological and experimental studies of the fungus which we just described.

CONCLUSIONS

1. I do not know yet the relationship between the *Actinomyces lepromatis* and leprosy. Its being isolated, is the partial repetition of the results of DEYCKE and RESCHAD's, WILLIAMS', ROST's, KEDROWSKI's, HERMANN de SCHROETTER's and others' researches.

2. Prof. W. J. KEDROWSKI, of Moscow, after long years studying, arrived at the conclusions that the bacilli of leprosy and of tuberculosis belong to a group of actinomyces.

3. Recently KEDROWSKI, BRULOWA, PLATONOV, etc., succeeded in getting the mutation of old cultures of bacilli of leprosy and of tuberculosis into actinomyces.

4. Cultures of *Actinomyces lepromatis* produced, in greasy mediums, acid-alcohol-fast bacillary forms.

NOTE—Paper read before the Brazilian Society of Biology, in October 31st of 1928.

Reacção nuclear de Feulgen nos espirochetas e nas bacterias

Pelos Drs. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ.

Em continuação ás experiencias que vinhamos effectuando a respeito da reacção de FEULGEN nos protozoarios, resolvemos verificar como ella se comportava em relação aos espirochetas.

Empregámos para esse fim os *Treponema duttoni* e *T. hispanicum* mantidos por passagem em camondongo na Secção de Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz. O sangue do animal altamente infectado, distendido em laminulas, era fixado, ora pelo sublimado-alcool, ora pelos vapores de acido osmico. A hydrolyse era effectuada em solução normal de acido chlorhydrico a 60º durante 4 minutos, após passagem em agua distillada pelo tempo de um minuto. Depois, as laminulas eram lavadas e conservadas durante duas horas no reactivo de FEULGEN.

Ao exame microscopico, os espirochetas não se mostravam corados, apezar da reacção ter se processado conforme era facil de verificar pela coloração dos nucleos dos leucocytos.

O modo de se comportar dos espirochetas os approxima ao das bacterias e por esse motivo fomos levados a estudar com mais detalhe a reacção em representantes desse ultimo grupo.

FEULGEN e ROSSENBECK estudando a reacção em diversos representantes das series animal e vegetal chegaram á conclusão que o nucleo dos *trypanosomas*, os *levedos* e as *bacterias* não se mostravam corados por esse methodo. Concluiram então que os sêres inferiores possuiam chromatina diversa da encontrada no nucleo de outros organismos, isto é, chromatina essa em cuja composição não entrava o acido thymo-nucleinico e sim um outro acido da mesma natureza (*Hefenucleinsäure*).

Para os trypanosomas e outros flagellados do mesmo grupo, BRESSLAU e SCREMIN demonstraram que, ao contrario do que pensavam FEULGEN e ROSSENBECK o nucleo e o blepharoplasto se coravam pela reacção nuclear. Esse resultado foi confirmado por VOIT, REICHENOW, JIROWECK e por nós mesmos. JIROWECK conseguiu tambem corar um granulo no interior dos levedos, demonstrando assim que esses sêres vivos possuem acido thymo-nucleinico na composição da sua chromatina.

Quanto ás bacterias, VOIT que estudou com detalhe a questão, diz que consideradas isoladamente ellas não se mostram coradas, mas nas partes espessas dos esfregaços, onde ha superposição de bacterias, observa-se nitida coloração violacea. Essa coloração não se apresenta com a mesma intensidade nos preparados que não soffreram hydrolyse.

VOIT interpreta esse facto considerando que as bacterias possuem como os demais seres vivos o acido thymo-nucleinico como parte constituinte da sua chromatina, a qual em pequena quantidade se encontra disseminada por todo o corpo da bacteria. Esse autor acha ser esse o motivo

pelo qual a bacteria se cora uniformemente e com uma intensidade tão pequena que não se torna apreciavel quando se considera um individuo isoladamente. Nas partes da preparação em que existe superposição dos corpos bacterianos essa coloração se mostra então evidente.

Já tinhamos observado quando estudámos o modo de se comportar do nucleo e do apparelho parabasal de alguns protozoarios para com a reacção de FEULGEN, que as bacterias existentes no material que serviu para os nossos estudos, não se corávam. Resolvemos então ensaiar a reacção em preparados feitos com cultura pura de algumas bacterias. A primeira que serviu para os nossos estudos foi o *Bacillus anthracis*. Empregámos como fixador vapores de acido osmico, fixando os preparados a humido. A coloração foi feita de accordo com a technica acima descripta. Ao contrario do que era de esperar, observámos nitidamente no interior dos baciilos granulos corados em violeta intenso. Empregámos tambem como fixador o alcool absoluto, permanecendo então os preperados 48 horas nesse fixador afim de excluir a hypothese de serem esses granulos constituidos de *plasmal* e obtivemos resultados identicos aos já assignalados. Esses resultados foram obtidos com culturas recentes de 16 a 18 horas, em agar inclinado, empregando para sementeira cultura antiga na qual só existiam formas esporuladas. De outra maneira não se obtem os mesmos resultados, observando-se então, algumas vezes, raros elementos apresentando granulações. Nestes casos verifica-se nitidamente o facto observado por VOIT, isto é, coloração violeta das partes da preparação onde ha superposição de corpos bacterianos.

As granulações acima referidas apresentam-se ás vezes isoladas na parte media do corpo do bacillo. De regra observam-se em cada bacteria duas granulações dispostas em diplococcus, cujos elementos podem se apresentar mais ou menos afastados um do outro. Um outro aspecto que tambem pode ser observado é o de bastonete. Os esporos, quando existem, apresentam-se hyalinos, refrigentes e destituidos de qualquer coloração.

As granulações que observámos e descrevemos no presente trabalho se assemelham ás que PARK, WILLIAMS e KRUMWIEDE observaram na mesma bacteria, corando-se em vermelho pelo methodo de GIEMSA e por elles consideradas como constituidas de chromatina.

Do que verificámos pode-se concluir que o *Bacillus anthracis* em certa phase de sua evolução, apresenta chromatina condensada sob a forma de granulos ou bastonetes, chromatina essa em cuja composição entra o acido thymo-nucleinico.

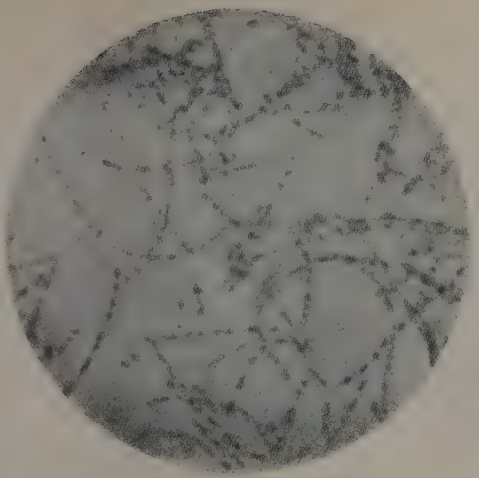


Fig. 1

Fig. 3

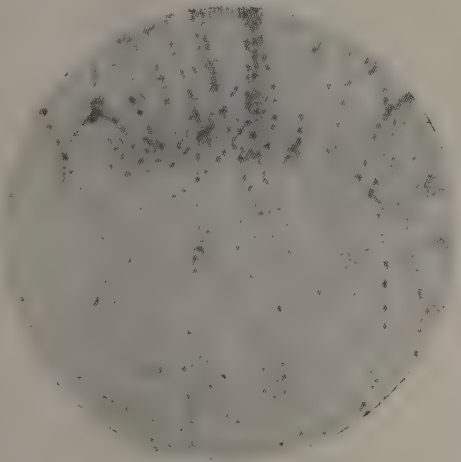


Fig. 2

Fig. 1—Microphotographia de um preparado de *Bacillus anthracis* corado pelo methodo de FEULGEN. Os granulos de chromatina apresentam-se em escuro e os esporos como espaços claros arredondados

Fig. 2—Microphotographia apresentando aspecto analogo ao da figura 1, não mostrando, porêm, os esporos.

Fig. 3—Desenho de alguns aspectos do *Bacillus anthracis* corados pelo methodo de FEULGEN, mostrando granulações no interior.

Fig. 1—Microphotographie d'une préparation de *Bacillus anthracis* colorée par la méthode de FEULGEN. Les granules de chromatine se présentent en couleur foncée, et les spores comme espaces clairs arrondis.

Fig. 2—Microphotographie présentant un aspect analogue à celui de la figure 1, moins, cependant, les spores.

Fig. 3—Croquis de quelques aspects du *Bacillus anthracis* colorés par la méthode de FEULGEN, montrant des granulations dans l'intérieur.

Réaction nucléaire de Feulgen chez les spirochètes et les Bactéries

Par les Drs. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA et JULIO MUNIZ.

A la suite des expériences que nous avions entreprises, relatives à la réaction de FEULGEN chez les protozoaires nous avons résolu de vérifier comment celle-ci se comporte par rapport aux spirochètes.

Nous avons employé, dans ce but, le *Treponema duttoni* et le *T. hispanicum* conservés par passage sur souris, à la section de Protozoologie de l'Institut Oswaldo Cruz. Le sang de l'animal infecté à haute dose, étendu sur lamelles, était fixé, tantôt par le sublimé-alcool, tantôt par les vapeurs d'acide osmique. L'hydrolyse était effectuée dans une solution normale d'acide chlorhydrique à 60° pendant 4 minutes après passage dans l'eau distillée pendant l'espace de une minute. Ensuite, les lamelles subissaient un lavage, et étaient placées pendant deux heures dans le réactif de FEULGEN.

A l'examen microscopique, les spirochètes ne montraient aucune coloration, quoique la réaction se soit produite ainsi qu'il était facile de s'en rendre compte par la coloration des noyaux des leucocytes.

La façon dont se comportent les spirochètes les rapproche des bactéries. Cette raison nous a amenés a étudier, d'une manière plus approfondie, la réaction chez des représentants de ce dernier groupe.

FEULGEN et ROSSENBECK, en étudiant la réaction chez divers représentants de la série animale et végétale, sont arrivés à la conclusion que le noyau des *trypanosomes*, les *levures* et les *bactéries* ne se colorent pas par cette méthode. Ils en conclurent que les êtres inférieurs possédaient une chromatine différente de celle qui se rencontre dans le noyau d'autres organismes, c'est-à-dire, une chromatine dans la composition de laquelle n'entrait pas l'acide thymo-nucléinique mais un autre acide de même nature (*Hefenucleinsäure)*, ou acide levuro-nucléinique.

Pour les trypanosomes et autres flagellés du même groupe, BRESLAU et SCREMIN ont démontré que, contrairement à ce que pensaient FEULGEN et ROSSENBECK, le noyau et le blépharoplaste se colorent par la réaction nucléaire. Ce résultat reçut confirmation par VOIT, REICHENOW, JIROWECK et par nous mêmes. JIROWECK réussit également à colorer un granule à l'intérieur des levures, démontrant ainsi que ces êtres vivants possèdent de l'acide thymo-nucléinique dans la composition de leur chromatine.

Quant aux bactéries, VOIT qui a étudié la question en détail, dit que, considérées isolément, elles ne se montraient pas colorées, mais que dans les parties épaisses des frottis, où il y a superposition de bactéries, on observe une coloration violacée très nette. Cette coloration ne se présente pas avec la même intensité dans les préparations qui ne sont pas passées par l'hydrolyse.

VOIT interprète ce fait, en considérant que les bactéries possèdent, comme tous les autres êtres vivants, l'acide thymo-nucléiniqne comme partie constitutive de leur chromatine, qui, en petite quantité, se trouve disséminée par tout le corps de la bactérie. Cet auteur croit que c'est là l'explication de la coloration uniforme de la bactérie, d'une intensité tellement faible, que l'on n'arrive pas à l'apprécier quand on considère un individu isolément. Dans les parties de la préparation, où il y a superposition des corps bactériens, cette coloration, alors, se montre évidente.

Nous avons déjà observé, lorsque nous avons étudié la façon dont se comporte le noyau et l'appareil parabasal de quelques protozoaires, vis-à-vis de la réaction de FEULGEN, que les bactéries existantes dans le matériel qui a servi à nos études, ne se coloraient pas. Nous résolûmes alors d'éssayer la réaction sur des préparations faites avec une culture pure de quelques bactéries. La première qui servit à nos recherches fut celle de *Bacillus anthracis*. Comme fixateur, nous employâmes les vapeurs d'acide osmique, la fixation ayant lieu par voie humide. La coloration fut faite d'accord avec la technique décrite ci-dessus. A l'encontre de ce que l'on pouvait espérer, nous observâmes nettement dans l'intérieur des bacilles des granules colorés en violet intense. Nous employâmes également comme fixateur l'alcool absolu, les préparations séjournant alors dans ce fixateur pendant 48 heures, afin d'exclure l'hypothèse que ces granules soient constitués de *plasmal*. Nous avons obtenu des résultats identiques à ceux déjà signalés. Ces résultats furent obtenus avec des cultures récentes, de 16 à 18 heures, sur agar incliné, en employant, pour ensemencer, une vieille culture dans laquelle n'existaient que des formes sporulées. En procédant différemment, on n'arrive pas aux mêmes résultats, et l'on observe alors, quelquefois, de rares éléments qui présentent des granulations. Dans ces cas, on observe nettement le fait, constaté par VOIT, c'est-à-dire, coloration violette des parties de la préparation où il y a superposition de corps bactériens.

Les granulations mentionnées ci-dessus, se présentent quelquefois isolées dans la partie mediane du corps du bacille. En règle générale, on remarque dans chaque bactérie, deux granulations disposées en diplococcus, dont les éléments peuvent se présenter plus ou moins éloignés l'un de l'autre. Un autre aspect qui peut s'observer aussi, c'est l'aspect de bâtonnet. Les spores, quand il en existe, se présentent hyalins, réfringents et dépourvus de toute coloration.

Les granulations que nous avons observées et que nous décrivons dans le présent travail ressemblent a celles que PARK, WILLIAMS et KRUMWIEDE ont constatées chez cette même bactérie. Elles se colorent en rouge par la méthode de GIEMSA, et ils les considèrent comme constituées par de la chromatine.

De ce que nous avons constaté, on peut conclure que le *Bacillus anthracis*, à une certaine phase de son évolution, présente de la chromatine condensée sous forme de granules ou bâtonnets, chromatine dans la composition de laquelle entre l'acide thymo-nucléinique.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

Dous phyllopodos, observados no Rio Grande do Norte

Pelo Dr. ADOLPHO LUTZ.

INTRODUCÇÃO.

Entre os organismos que vivem na agua doce os pequenos crustaceos da ordem *Entomostraca* têm um papel preponderante por sua frequencia e variedade. Entre estes se destacam os *phyllopodos* ou *branchiopodos* pela alternação da propagação sexual e parthenogenetica. Um grupo destes, chamado *Cladocera*, é composto por especies pela maior parte muito pequenos, mas extremamente abundantes e por isso bem conhecidos. Outro grupo, chamado *Euphyllopoda*, contem especies maiores, porém muito mais raras que apparecem de um modo erratico para desapparecer logo por muito tempo. São encontrados de preferencia em poças de agua, devidas a chuvas ou inundações transitorias. Por isso as observações têm mais importancia sendo cuidadosamente registradas.

Os primeiros *Euphyllopodos* foram observados na *Europa* ha cerca de duzentos annos e durante este longo periodo as observações e estudos chegaram a uma perfeição que falta de nos outros continentes, explorados só muito depois. Assim mesmo a *Asia*, a *Africa* e a *America do Norte* forneceram um material abundante. A *America Meridional* parece mais pobre. Na litteratura até 1918 não achei mais do que 14 a 15 especies das quaes apenas 6 ou 7 do Brasil. O numero dos observadores não é maior e poucas especies foram encontradas duas ou tres vezes. Assim a presente communicação, embora curta, parece justificada, porque traz uma nova especie e nova observação de outra, apenas uma vez observada em terreno brasileiro.

Eis a lista dos *Phyllopodos* observados no Brasil:

Genero *Estheria*, especies: *brasiliensis* BAIRD;
Dallasi BAIRD.

Genero *Eulimnadia*, especies: *antillarum* BAIRD, Rio Grande do Sul, leg. JHERING; ? *texana* PACKARD, S. Paulo (LUTZ), det. JHERING; *brasiliensis* SARS, criada de lodo secco de S. Paulo, mandado por JHERING, prov. identica com a anterior.

Genero *Branchinecta*, especie: *Iheringi* LILLJEBORG, Rio Grande do Sul.

Genero *Cyclestheria*, especie *Hislopi* BAIRD, Cuyabá (leg. EHRENREICH, det. WEITNER). Tambem em Paraguay (DADAY, LUTZ).

Outros *Phyllopodos* da America do Sul.

Genero *Limnetis*, esp. *rotundirostris* DADAY, Patagonia.
Genero *Artemia*, esp. *Jelski* DADAY, Peru (Callao).
Genero *Branchinecta granulosa* DADAY, Patagonia.
Genero *Dendrocephalus*, esp. *cervicornis* (WELTNER), Argentina Córdoba).
esp. *Geayi* DADAY, Venezuela.
Genero *Apus*, esp. *frenzeli* THIELE, Argentina (Córdoba).
Genero *Lepidurus*, esp. *patagonicus* BERG, Patagonia.

ESPECIES OBSERVADAS.

I. **Dendrocephalus ornatus** n. sp.
(Estampas I e II)

Este phyllopodo foi encontrado no Rio Grande do Norte, vinte kilometros além de Macahyba, em 19 de Julho de 1928. Ao lado direito da estrada de automovel que vae da capital para o interior, havia uma poça larga e funda com agua muito barrenta. Pescando larvas de anophelinas obtivemos tambem um crustaceo transparente com grande numero de pernas, olhos pretos e appendices caudaes em forma de pennas escarlates. Moviam-se rapidamente ou ficavam parados com as costas para baixo e as pernas em vibração constante. Julguei logo que se devia tratar de uma especie de *Branchipus* ou algum genero alliado. Guardei-os vivos durante alguns dias, mas morreram pouco a pouco. Dos que foram fixados logo em alcool, approveitei quatro exemplares bastante bons sendo um macho e o resto femeas adultas. Estas, de 12 mm. de comprimento, tinham nos ovarios e no sacco de incubação ovos pigmentados e uma massa escura que se confundia com o conteudo intestinal. O macho, de corpo muito mais robusto com 16 mm. de comprimento, tinha as antennas do segundo par muito complicadas e só com difficuldade se conseguiu desembrulhar e desenhal-as. (Est. II.)

Na sua extensa monographia da familia que inclue os conhecidos generos *Artemia*, *Branchipus*, *Chirocephalus* e *Streptocephalus*, DADAY estabeleceu grande numero de generos novos que se caracterisam principalmente pelas antennas dos machos, as quaes mostram uma polymorphia extraordinaria, e uma complicação progressiva. A nossa especie entra naturalmente no genero *Dendrocephalus* que continha apenas duas especie bastante maiores, ambas sul-americanas e indubitavelmente differentes. Dou um desenho ampliado das primeiras antennas do macho, cujas ramificações são mais complicadas que em qualquer especie conhecida. As primeiras antennas (que se percebem na mesma figura atraz das segundas) são relativamente simples. A figura da femea mostra que esta segue um typo geral bastante commum. Ambos os sexos são caracterisados pelos appendices caudaes bem desenvolvidos e muito ornamentaes, devido a sua côr escarlate brilhante, que justifica o nome generico.

As gravuras que accompanham esta communicação mostram os caracteres importantes. Infelizmente não consegui obter mais material vivo. O Dr. WALDEMAR ANTUNES, que me accompanhou na excursão, visi-

tou mais tarde a mesma poça, mas já a encontrou secca e procurou a especie sem resultado em outras aguas visinhas. Talvez será possivel crial-a mais tarde do lodo barrento que formava o fundo da poça.

II. Cyclestheria Hislopi BAIRD.

Estampa III

Nas margens da *Lagoa Secca*, nos arrabaldes de *Natal*, achei, entre outros organismos aquaticos, um pequeno crustaceo bivalvo de forma quasi redonda e com ca. de 5 mm. de comprimento. Era caracterisado como *Euphyllopodo* pelo grande numero de pernas. Gostava de ficar encostado, ora a plantas aquaticas, ora ao proprio fundo, ou a nadar perto deste com as costas para baixo. Na cavidade dorsal carregava ovos ou filhotes já desenvolvidos, alguns dos quaes appareceram logo na agua ambiente, mostrando a mesma forma que os adultos. Por este facto e pela formação, caracteristica reconheci que se tratava de uma *Cyclestheria*, igual a uma colhida em *Cuyabá* por EHRENREICH e determinada por WELTNER, e outras, assignaladas por DADAY do *Paraguay*, onde tambem os encontrei na *Lagoa de Ipacaray*. Só havia uma especie, conhecida pelo nome de *hislopi* BAIRD, que os autores citados consideraram como correspondendo á especie por elles observada.

Aqui convem mencionar um facto extraordinario e quiçá unico em zoologia. As onze observações registradas limitam-se á zona tropical da *Asia* ou ao hemispherio do sul, mas aqui dão como patria tanto a *Australia*, a *Asia*, a *Africa* e a *America Meridional* como as ilhas *Ceylon* e *Sansibar*. Para explicar uma repartição tão extensa e ao mesmo tempo tão erratica, só podemos escolher entre a supposição do transporte pelo homem ou por aves aquaticas, a menos de recorrer ás hypotheticas ligações de continentes em periodos geologicos afastados por pontes hoje submersas, explicação que desperta varias objecções evidentes. O transporte dos ovos a tão grandes distancias e atravez dos mares, por meio do lodo adherente ás pernas ou ao corpo de aves aquaticas certamente não podia occorrer frequentemente. As distancias terrestres podem ter sido vencidos por meio de etapas, sendo certo que conhecemos apenas uma minima parte dos lugares onde ocorre o genero *Cyclestheria*.

Para manter-se o typo de uma especie atravez de tanto tempo, tamanhas distancias e durante tantas gerações em rapida successão, é preciso attribuir-lhe uma constancia tanto mais notavel que nestas condições outros phyllopodos teriam já desenvolvido novas variedades ou mesmo especies e generos. Entretanto os autores referem todas as *Cyclestherias* a uma unica especie. Apenas THIELE releva nos exemplares, descriptos por DADAY, ligeiras differenças que podiam talvez justificar a creação de uma nova especie, que elle propõe chamar *sarsiana*. A principio estive disposto a admittir esta differenciação, mas depois de obter e comparar as descripções e desenhos que SARS deu dos exemplares de origem australiana, cheguei á convicção de que se trata de uma só especie. As pequenas differenças notadas explicam-se por defeitos dos originaes ou dos desenhos ou finalmente pela idade e por leves aberrações individuaes.

O desenho da estampa III foi tirado, independentemente do conhecimento das figuras de SARS e de DADAY, de uma femea do meu material. As differenças notadas referem-se apenas a detalhes tão pouco distinctos

que facilmente podem escapar á vista ou perder-se nos exemplares conservados. Nas feições importantes o desenho combina bem com as indicações de DADAY e ainda mais com os desenhos de SARS que trabalhou com material obtido de lodo, mandado de Queensland, na Australia.

Como os outros observadores não encontrei machos no meu material. Apenas SARS observou um macho novo, tirado da cavidade incubadora de uma femea gravida, mas não chegou a observar os ovos fecundados que podem resistir á deseccação.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS.

Estampa I: Femea adulta de *Dendrocephalus ornatus* n. sp. com ovos no sacco de incubação. × 20.

Estampa II: Antennas do macho; segundo par com 12 pontas maiores no processo impar e dous segmentos nos chifres pares, o primeiro par de antennas com estructura simples.

Estampa III: *Cyclestheria hislopi* BAIRD. Femea adulta com ovos no espaço de incubação. × 12.

BIBLIOGRAPHIA.

(Em seguida dou uma lista de publicações que se referem a *euphyllopodos* da *America Meridional* e especialmente do *Brasil*. Termina com o anno 1918, porque depois não encontrei mais referencias. A litteratura que estudei na bibliotheca deste instituto ou mandei vir depois, está marcada por um asteristico; o resto não consegui consultar no original. A publicação de JHERING contem uma lista bibliographica até 1895 e as publicações de DADAY trazem ainda outras referencias).

1. BAIRD, Monograph of the family *Branchiopodidae*. Proceed. of the Zool. Soc. 1849, p. 84.
2. BERG, C., Dados sobre alg. crustaceos novos p. la fauna argentina. Comm. del Museo Nac. de Buenos Aires. T. 1, n. 7, p. 223. 1900.
* 3. DADAY, EUG., Untersuchungen ueber die microsc. Fauna von Paraguay. Zoologica 1905.—Leipzig.
* 4. DADAY, EUG., Monograph. systémat. des Phyllopodes anostracés. Ann. des Sc. natur.: zoologie, 8ième Sér., T. 11, 1910
* 5. JHERING, V., Os crustaceos phyllopodos do Brazil. Rev. do Museu Paulista, 1895, V. 5, p. 165.
* 6. LILLJEBORG, W., Diagnose zweier Phyllopoden von Suedbrasilien, Abh. d. naturw. Ver. B.emen, p. 424, 1889.
* 7. LUTZ, AD., Mem. do Inst. Osw. Cruz, Vol. X, Fasc. II, p. 169—70 (Crust.) 1918.
* 8. PACKARD, A. S., A monogr. of the phyllopod crustacea of North America. 1881.
* 9. SARS, D. O., On *Cyclestheria hislopi*. Vidensk.—Selsk. Forh. I. Christiania, 1887.
10. SARS, G. O., On a new brasil. phyllopod, *Eulimnadia brasiliensis*. Arch. for Math. og Naturw., T. 2, n. 6. 1902.

* 11. SIMON, E., Etude sur les crustacés du sous-ordre *Phyllopodes*. Ann. de la Soc. Entom. de France, 8, sér. 6, p. 395, 1886.
* 12. THIELE, J., Einiges ueber *Phyllopoden* des Berliner Mus. I. Ueber suedamerik. *Phyllopoden*. Sitzungsber. d, Gesellsch. naturf. Freunde in Berlin, p. 288, 1007.
* 13. WELTNER, W., Ibidem 1888—89, p. 199 (Ueber *Cyclestheria hislopi*).
* 14. WELTNER, W., Ibidem 1890, N. 5, p. 35 (*Branchipus cervicornis* n. sp. aus Suedamerika).
* 15. WOLF, EUG., Die geograph. Verbreit. d. *Phyllopoden*. Verh. d. deutschen zoolog. Gesellsch. 1886, p. 393.

DEUX PHYLLOPODES DE L'ÉTAT DE RIO GRANDE DO NORTE.

Résumé: Le 19 juillet 1928 l'auteur trouva près de *Natal*, capitale de l'État de Rio Grande do Norte, a 5º 47' au sud de l'équateur, un nouveau *Dendrocephalus* qui portera le nom *ornatus*, dû a ses appendices caudales teints d'écarlate brillant. La femelle (Pl. 1) atteint 12 mm. de longueur e contient des oeufs noirs dans sa cavité d'incubation. Le mâle, beaucoup plus robuste, atteint 16 mm. et montre, outre les caracteres sexuels, une modification extrémement compliquée des deuxièmes antennes (qui dans la planche II sont vues devant les premières). L'espèce est plus petite que les deux autres décrites de l'Amérique du Sud et se distingue facilement par les antennes du mâle. Elle fut trouvée au bord de la route dans une flaque large et profonde d'eau de pluie argileuse. Les exemplaires rapportés moururent en quelques jours et la mare, lors d'une seconde visite, fut trouvé sèche.

L'autre espèce, observée en 9. 7. 28 dans un étang naturel tout-près de la capitale, avait déjà été observée à *Matto Grosso* et en *Paraguay* et déterminée comme *Cyclestheria hislopi* BAIRD. THIELE pense que les individus de l'Amérique du Sud, pour cause de quelques petites différences, pourraient bien former une autre espèce qu'il propose d'appeler *sarsiana*, mais la comparaison des desseins et descriptions avec mes exemplaires ne parait pas soutenir cette idée. Tout-de-même la répartition connue de cette espèce est extrêmement curieuse et peut-être unique en zoologie. Elle a été signalée à *Nagpur (Hindoustan)*, *Ceylon, Queensland (Australie)*, *Célèbes*, *Afrique orientale* et *Sansibar*; seulement le premier lieu se trouve bien au nord de l'équateur, mais encore dans la zone tropicale, comme toutes les autres localités. L'explication de cette extension sur les deux mondes est tout ce qu'il y a de plus difficile, puisque entre les localisations il n'y a pas seulement d'énormes distances sur terre (que l'on pourrait expliquer par un défaut d'observations), mais des espaces tres étendus, occupés par la mer. L'intervention de l'homme ne saurait expliquer ces faits et le transport par les oiseaux aquatiques ne pourrait être qu'un fait tout-a-fait excepcionnel pour les grands trajets océaniques. Le recours aux terres hypothétiques, qui formaient des ponts intercontinentaux dans des périodes géologiques extrêmement reculées, rencontre des objections évidentes. En tous les cas on ne peut qu'admirer la constance avec laquelle le type de l'espèce s'est maintenu durant d'innombrables générations et a travers de telles distances quand les autres phyllopodes ont formé non seulement des variétés, mais même un grand nombre de genre et de familles.

EXPLICATION DES PLANCHES.

Planche I: Femelle adulte de *Dendrocephalus ornatus* portant des oeufs dans la poche d'incubation. × 20.

Planche II: Antennes du mâle; la deuxième paire portant 12 pointes fortes sur le procès impair et deux cornes bisegmentés, une de chaque côté. Première paire d'antennes de structure simples.

Planche III: *Cyclestheria hislopi* BAIRD. Femelle adulte portant des oeufs dans l'espace d'incubation. × 12.

TWO NEW PHYLLOPODS FROM THE STATE RIO GRANDE DO NORTE.

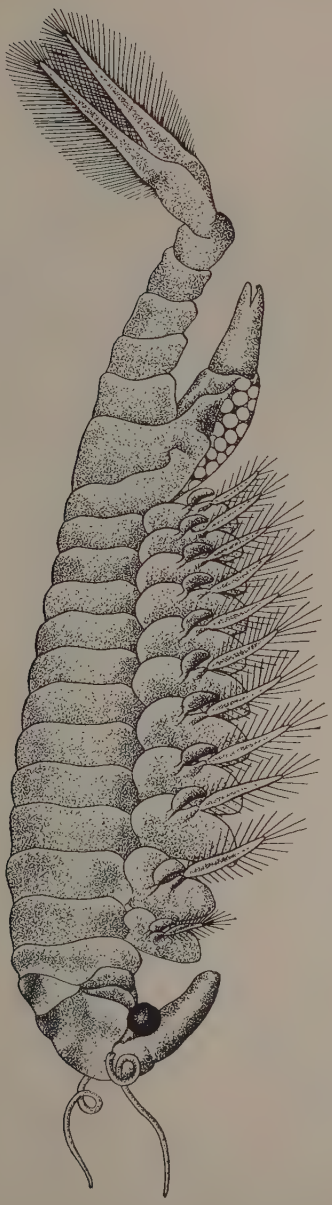
Summary: On the 10th of july the author found about 36 km. from *Natal*, capital of the brazilian State Rio Grande do Norte, at 5° 47' southern latitude, a new kind of *Dendrocephalus* which he proposes to name *ornatus* on account of the brillant scarlet colour of the caudal appendices. The female (Pl. 1) reaches 12 mm. in length and shows black eggs in its breeding cavity; the male attains 16 mm. and is much stouter, while its second antennae (which in Pl. 2 are seen in front of the first pair) show the most complicated structure, so far seen and delineated. They form the principal feature of the species which was caught in the muddy water of a large and deep puddle, formed by rain at the side of the road. This later dried up, while the specimens brought alive to the capital died in a few days.

The second species, a *Cyclestheria*, was observed in a permanent natural pond in a suburb of *Natal*. Like other specimens from *Matto Grosso* and *Paraguay*, it was determined as *hislopi* BAIRD, the only known species. THIELE thought that the brazilian species might be separated under the name *sarsiana*, but the comparison of the specimens with other descriptions and drawings does not support this view. The strangest fact about this species is its distribution which includes western *India* (*Nagpur*), *Ceylon*, *Australia* (*Queensland*), *Celebes*, *East-Afrika* and *Sansibar*, only the first place being considerably north of the equator. This distribution is very hard to explain, as there are not only large distances by land, but wide stretches of sea between these places, so that the supposition of a gradual transport by man or animals does not help much. Transportation by means of aquatic birds, if possible, must be extremely rare while the supposed landconnections in former geological periods can hardly furnish a satisfactory explanation. At any rate, it seems very wonderful that the same type should have kept true over such distances and through countless generations while other phyllopods seem to have formed not only varieties but many new species and even genera.

EXPLANATION OF THE PLATES.

Plate I: Adult female of *Dendrocephalus ornatus* n. sp. with eggs in the incubation pouch. × 20.

ESTAMPA I



ESTAMPA II

ESTAMPA III

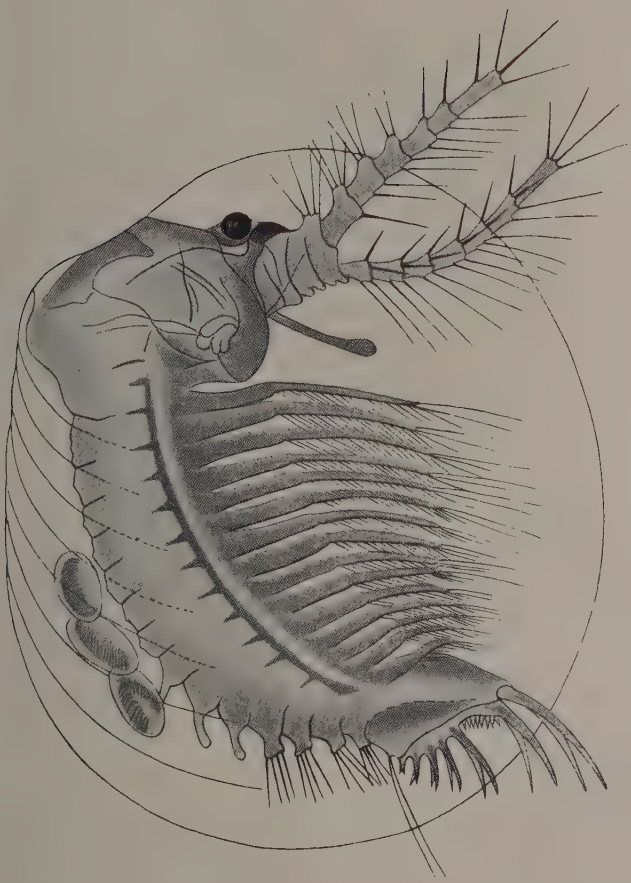


Plate II: Antennae of male; second pair with 12 larger points on the median part and two segments on each lateral horn. First antennae of simple structure.

Plate III: *Cyclestheria hislopi* BAIRD. Adult femelle with eggs in the incubation space. × 12.

ZWEI PHYLLOPODEN AUS RIO GRANDE DO NORTE.

Auszug aus obiger Mitteilung: Am 19ten Juli 1928 fand der Autor in der Naehe von *Natal*, Hauptstadt des brasilianischen Staates *Rio Grande do Norte*, bei ca. 5° 47' suedlicher Breite, einen neuen *Dendrocephalus*, der, wegen seiner brillant scharlachroten Schwanzanhaenge, *ornatus* genannt wurde. Das Weibchen (Tafel I) wird ca. 12 mm. lang und zeigt in seinem Bruetsack schwarze Eier; das Maennchen ist 16 mm. lang und bedeutend dicker. Seine zweiten Antennen, die auf Tafel 2 vor den ersten sichtbar sind, erreichen wohl den hoechsten Grad von Complizirtheit, der bisher abgebildet wurde und sind fuer die neue Art charakteristisch. Sie and sich in dem lehmigen Wasser einer grossen und tiefen Pfuetze an feinem Strassenrande. Die mitgenommenen Exemplare starben allmaelig ab und die Pfuetze trocknete spaeter aus.

Die zweite Art (9-7-28 in *Natal* beobachtet) war eine *Cyclestheria*, sehon frueher in *Matto Grosso* und *Paraguay* gefunden und mit *hislopi* BAIRD identificirt. THIELE meint, dass vielleicht die brasilianische Art als *sarsiana* abgetrennt werden sollte, indessen spricht die Vergleichung der Originalien und unabhaenger Zeichnungen nicht dafuer. Es ist eine hoechst auffaellige Tatsache, dass das Vorkommen dieser Art ausserdem in *Vorderindien, Ceylon, Australien (Queensland), Celebes,* Ostafrika und *Sansibar* festgestellt wurde und zwar nur einmal ziemlich weit noerdlich vom Aequator. Die Erklaerung dieser Verbreitung stoesst auf die groessten Schwierigkeiten, da zwischen den einzelnen Lokalitaeten weite Meere liegen und nicht bloss Landstriche, in denen die Art uebersehen werden koennte. Transport durch Menschenhand kann fuer groessere Strecken kaum in Betracht kommen und ein solcher durch Wasservoegel muesste jedenfalls ein sehr seltenes Ereigniss sein. Die Erklaerung der Verbreitung ueber hypothetische, in frueheren geologischen Perioden vorhandene Landbruecken ohne Veraenderung der Art kann ebenfalls kaum befriedigen. In allen Faellen kann man sich nur darueber wundern, wie, ueber solche Strecken und durch zahllose Generationen, derselbe Typus festgehalten wurde, waehrend sich bei anderen Phyllopoden nicht bloss Varietaeten, sondern neue Arten und sogar Gattungen gebildet haben.

ERKLAERUNG DER TAFELN.

Tafel I: Ausgewachsenes Weibchen von *Dendrocephalus ornatus* n. sp. mit Eiern im Brutsack. × 20.

Tafel II: Antennen des Maennchens; das zweite Paar zeigt einen mittleren Fortsatz mit 12 groesseren Spitzen und je einen seitlichen mit swei Segmenten. Erstes Paar von einfacher Struktur.

Tafel III: *Cyclestheria hislopi* BAIRD. Ausgewachsenes Weibchen mit Eiern im Brutraum. × 12.

El concepto Indice Delta en la determinación del valor funcional de los riñones.

Por el Dr. LUIS PRADO BARRIENTOS.

(Del Curso de Aplicacion del Instituto Oswaldo Cruz).

Antes de entrar en el asunto que motiva esta exposición, expreso mis agradecimientos a los señores profesores, Dr. GOMES de FARIA y CARNEIRO FELIPPE, a cuyos estímulos se deben la génesis y la construcción de un pequeño aparato que determina mecanicamente lo que ha venido en llamarse *Indice Delta*.

Entre las multiples investigaciones encaminadas a averiguar el valor funcional de los riñones en un momento dado, ninguna de ellas tiene actualmente mas aplicacion—en patologia renal—que la determinacion de la Constante ureo-secretoria de AMBARD.

La funcion biológica de eliminacion ureica está regida por leyes deducidas experimentalmente por L. AMBARD.—Esas leyes se traducen en formulas matemáticas, que es preciso resolverlas en cada caso, en vista de los datos proporcionados por el laboratorio.

La Constante ureo-secretoria, en cuanto se la considera como problema sometido a calculos numéricos, presenta dos inconvenientes, que se ha tratado de allanar.

Primeiro.—Las cifras que expresan la Constante ureo-secretoria, siendo números fraccionarios (desde 0,015 aproximadamente, hasta 0,800, o mas) no presentan al clinico la facil comprension del valor funcional de los riñones, en lo que se relaciona con la escresion ureica.

Segundo.—No todos los medicos estan familiarizados con la resolucion de problemas numéricos, ni a todos los tecnicos de laboratorio les es dado substraer el tiempo dedicado á cuidadosas investigaciones de las casi siempre dependen el diagnóstico, el prognóstico y el tratamiento de las enfermedades.

Para evitar el primer inconveniente, CARRION y HALLION, ya propucieron expresar el valor de la excresion ureica en porcentage, basandose en que la cifra normal de la Constante ureo-secretoria 0,070, corresponde a 100.

C. Mc LEAN, en su trabajo "The numerical laws governing the rate excretion of urea and chlorides in man" (Journal of exp. Med.—1925—V. 22 - pgs. 212—236), fundado en gran número de observaciones estudiadas cuidadosamente y empleando en las dosificaciones de urea el *xantidrol*, primeiro estabelece que, la Constante ureo-secretoria normal es: 0,080 y no 0,070, como hasta entonces se aceptaba; segundo propone que, para expresar los cambios de valor de la Constante, de una manera matemáticamente correcta, basada en la escala 100, se use de una fórmula adoptada a las

leyes de AMBARD, que expresaria el *Indice de excresion ureica.* El numero 100 o standard normal, corresponderia a la normal 0,080 de la Constante ureo-secretoria de AMBARD. Las variaciones serian expresadas en terminos normales formando la serie sucesiva de los números de orden. Ver el cuadro de la pagina n. 16.

El trabajo que hoy presento, lleva el mismo fin, es decir: apreciar en forma simple y de facil comprensión el valor de excresión ureica, representando ese valor et *porcentage de trabajo renal* para la excresión de la urea, que viene a ser el desvio del Indice normal de Mc LEAN, a lo que se ha denominado *Indice Delta.*

El segundo inconveniénte ha sido allanado en el sentido de determinar los valores de la Constante ureo-secretoria, por dispositivos ó aparatos que dispensan cálculos numéricos.

a) —En primer término debemos citar el «Abaque de ANDRE' GUERBET» (Journal de Pharmacie et Chimie.—tomo 30—1924—pag. 68), que reduce el problema numérico de la Constante DE AMBARD a simples manipulaciones de escalas nomográficas, yá estudiadas por MAURICE OCAGNE.

b) —El abaco de BERGEROL y LAZARD, en que hay necesidad de calcular el *debit* ureico.—

c) —El Ureografo de HAMEL, aparato que he tenido la oportunidad de conocer ultimamente, despues de concluido este trabajo. Es un aparato muy ingenioso de mecanismo interno, en que el problema se reduce á anotar los datos proporcionados por el laboratorio, obteniendose la Constante automáticamente.

d) —El Aparato destinado a la determinación del *Indice Delta,* que tambien determina, y simultaneamente, el Indice de Mc. LEAN y la Constante ureo secretoria de AMBARD, y para cuya construccion se tuvo en cuenta el ábaco de ANDRE' GUERBET.

Constante de AMBARD— Si se examina el cuadro comparativo de la pagina n. 16 se verá que en las variaciones de K (constante ureo-secretoria de AMBARD), a partir del valor normal, que es, 0,080 las cifras inferiores a ese valor, indican un exeso de trabajo renal para la eliminacion ureica (caso de degeneración amiloidea del riñon, nefritis hidropígena, diabetis, fiebre amarilla, etc.). Inversamente las cifras superiores a 0,080 indican una insuficiencia renal para esa funcion.

El *Indice de* Mc LEAN, fundado en las leyes de AMBARD, concidera como valor normal 100. Las cifras superiores a 100 indican un exeso de funcion, pudiendo llegar hasta 400, 500, etc.

Las cifras inferiores a 100 indican deficiencia renal, pudiendo bajar teoricamente hasta la unidad.

Tanto en la escala de numeros fraccionarios de la Constante de AMBARD, como en la escala que corresponde al Indice de Mc LEAN, se dificulta la apreciacion del valor funcional de los riñones. Tal es el caso

cuando se dice que la constante K es 0,282, ó, si se expresa que el Indice de Mc. LEAN es 400 o bien 7.

El concepto Indice Delta.—Determinado como es el nivel normal de funcionamiento renal si se traza una linea en ese punto, es logico considerar que habiendo una alteración que se traduzea por exeso o por deficiencia de trabajo renal, los numeros que marquen exeso sean positivos y los numeros indicadores de deficiencia sean negativos.

Tratandose de un caso cualquiera, tambien es lógico considerar que para referirse a la linea normal, se tenga que expresar con cuantas unidades de exeso o de deficiencia funcionan los riñones y para eso se tiene que comenzar a contar por la unidad.

En resumen se dá un sentido algébrico a la funcion renal, pues, ella cuando alterada como toda funcion—sea ella biologica o matemática—se inclina para mas o para menos. Fuera de esas consideraciones se debe recordar que el Indice de Mc. LEAN, bien interpretado, expresa el porcentaje del valor funcional (yá establecido por CARRION y HALLION, para el caso de que la constante normal se considera 0,070) yá que su formula se deduce de la siguiente proporcion: (K normal)^2: 100 : : (K anormal)^2: I en que K es simbolo de la Constante ureo-secretoria de AMBARD é I es simbolo del Indice de Mc LEAN. En la escala construida para expresar el Indice Delta, el cero (0) se corresponde con 0,080 de la Constante de AMBARD y con 100 del Indice de Mc. LEAN. De ese punto cero parten cifras sucesivas en serie ascendente precedidas del signo positivo y cifras en serie descendente precedidas del signo negativo.—Ya se ha expresado que *esas cifras representan el porcentage de funcionamiento renal para la excresión de la urea.*

Se citan los siguientes ejemplos para hacer ver hasta que punto facilita la apreciaciacion del valor funcional a que nos hemos referido.

Si el Indice Delta en un caso dado es menos treinta por ciento—(—30 por ciento), indica que los riñones tinen un valor funcional disminuido en un treinta por ciento o sea que les queda todavia un 70 p. c. de trabajo util. Indice Delta: menos 80 p. c., que apenas los riñones tienen un trabajo util de 20 p. c. Indice Delta: mas 200 o 300 p. c. indican que el valor funcional se ha elevado al doble o al triple de la funcion normal.

Para allanar el segundo inconveniente que se ha citado al comenzar esta exposicion (me refiero al problema numérico que encierra la investigacion del valor funcional de les riñones para la escresion ureica), se ha construido un aparato con la forma y funcionamiento semejantes a los de las reglas de cálculo usuales y que se ha denominado: *Aparato para la determinacion del Indice Delta* (cuyo diseño se acompaña en la pag. 15).

No parece indispensable—dada la naturaleza de este trabajo—hacer la descripcion de ese dispositivo mecanico qne reduce el problema numérico a simples manipulaciones de escalas deslizables en fase de otras escalas fijas.

Se considera en cambio necesario hacer presente:

1º—Que el aparato en cuestion determina con mucha exactitud y en el espacio de 30 a 40 segundos, no solo el Indice Delta, que se ha definido, sino tambien, simultaneamente, la Constante ureo-secretoria de AMBARD y el Indice de Mc LEAN.

2º —Que las escalas 4, 5, 10 y 11 no constituyen en si mismas mas que simples escalas de referencia y que tienen como unica función determinar alturas o niveles de las otras escalas que llevan los datos esenciales de los problemas a solucionar.

3º —Las escalas 1, 2, 3, 6 y 9 son destinadas a anotar simplemente los datos proporcionados por el laboratorio, auxiliandose, con algunos puntos de referencia constituidos por saetas.

4º —Las escalas 7 y 8 proporcionan por simple lectura las incognitas buscadas.

Las esplicaciones anteriores tienen el fin de advertir que la impresion de complejidad que queda despues de una simple inspección del conjunto de las escalas, es unicamente aparente, pues se desvanece esa percepcion despues de la verificacion de un problema cualquiera en una primera vez, siguiendo las instrucciones que el aparato lleva en la columna "Manejo".

Cabe todavia hacer una referencia esplicativa relacionada con las formulas, que presenta el aparato en el espacio queda por encima de las escalas 7 y 8.—

En la determinación de la Constante de AMBARD se contempla dos casos (1): caso en que el problema lleva el factor peso del paciente; (2), caso en que el problema no tiene ese factor. Cada uno de ellos una formula especial:

$$(1)\quad K = \frac{Ur}{\sqrt{D \cdot \frac{70}{P}} \times \sqrt{\frac{C}{25}}} \qquad (2)\quad K = \frac{Ur}{\sqrt{D} \times \sqrt{\frac{C}{25}}}$$

Los simbolos que representan los factores que entran en el problema son los siguientes:

(V)—Volumen de la orina recogida.
(C)—Concentración de urea en la orina, gramos por mil.
(T)—Duración de la prueba.
(P)—Peso del paciente.
(Ur)—Concentración de urea en la sangre, gramos por mil.
(K)—Representa la incognita buscada.

En las formulas trascritas anteriormente encontramos que D (debit), representa un valor resultante de calculos previos, efectuados con los valores (C) y (V) en función del tiempo (T). El simbolo D es igual a: $\frac{1440.\ V.\ C}{1000.\ T}$

Substituyendo en las formulas citadas en lugar de D sus valores correspondientes tenemos:

$$(1)\quad K = \frac{Ur}{\sqrt{\frac{70.1440.\ V.\ C}{P.\ T.\ 1000.\ 5}} \sqrt{C}} \qquad (2)\quad K = \frac{Ur}{\sqrt{\frac{1440\ V.\ C}{1.000 \times T \times 5}} \sqrt{C}}$$

Simplificando esas formulas y aplicando los logaritmos tenemos:

$$(1)\quad K = \frac{Ur}{\sqrt{\frac{20,16 \cdot V \cdot C \sqrt{C}}{P \times T}}} \qquad (2)\quad K = \frac{Ur}{\sqrt{\frac{0,288 \times V \cdot C \sqrt{C}}{T}}}$$

(1) log. K = log. Ur — 1/2 [(log. 20,16 + log. V + 3/2 log. C)— (log. P + log. T)].

(2) log. K = log. Ur — 1/2 [(log. 0,288 + log. V + 3/2 log. C)— log. T)].

Estas ultimas formulas son empleadas en este Instituto, por el Profesor CARNEIRO FELIPPE.

La formula de Mc LEAN, para determinar el Indice de escresion ureica, y que hoy se denomina simplemente Indice de Mc LEAN, es la siguiente: $I = \frac{8,96 \cdot D \cdot \sqrt{C}}{P \cdot (Ur)^2}$

Substituyendo D por su valor $\frac{1440 \cdot V \cdot C}{1000 \cdot T}$ y simplificando al formula se tiene: $I = 12,90 \cdot \frac{V \cdot \sqrt{C}}{T \cdot P \cdot (Ur)^2}$

Aplicando logaritmos se tiene: log. I = (log. 12,90 +log. V + 3/2 log. C)—(log. T + log. P + 2 log. Ur).

Esta ultima formula es la que usó el Dr. CARNEIRO FELEPPE en las aulas del Curso.

Conocido el Indice de Mc LEAN, el Indice Delta se obtiene por simple calculo mental, o bien por la formula: $(\pm \delta) = I - 100$ y reciprocamente $I = \delta + 100$.—

En el aparato que ahora se presenta, la escala, 8, traduce al mismo tiempo, el Indice de Mc LEAN y el Indice Delta. Basta suponer en esa escala anotados los numeros de orden en serie ascendente comenzando por la unidad constituyendo asi la escala Indice de Mc LEAN, en correspondencia de la escala del Indice Delta.

En resumen este trabajo presenta a la consideración de los clinicos y laboratoristas:

1º —El concepto Indice Delta, que es la tradución al lenguaje matemático de un fenomeno biológico.

2º —Un aparato, que por simples manipulaciones, determina no solo el Indice Delta que se ha definido, si no tambien y simultaneamente, el Indice de Mc LEAN y la Constante ureo secretoria de AMBARD.

Manguinhos, Diciembre de 1928.

MANEJO.– Verso.– 1ª: solta de 1 em (V) – 2ª solta de 3 em solta de 2.– 3ª (P) em caso de haver peso – ou solta de (P) em caso de não haver esse factor – neste em 4 um numero que se procura.– 4ª leve-se (T) a (P), ou em (V), segundo o caso. 5ª: Colloque-se o retrume do cursor sobre a linha denotada em 4 que prolongada pelo mesmo marca em 5 um numero que simultaneamente fica cruzado em 11 ao mesmo.– 6ª: Feita esta conclua esse numero da escala 11 com o igual de 10.–

1 (P)-Peso do paciente em Kilogrammos.–

2 (V)-Volume da urina recolhida, em centimetros cubicos.–

3 (T)-Duração da prova. Minutos.–

4 Escala auxiliar.–

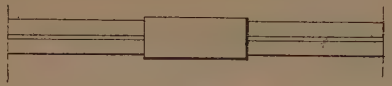
5

RIO DE JANEIRO - 1928

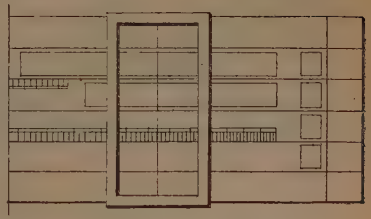
Dr Luiz Viana Filho
Medico Clinicista

APPARELHO DESTINADO A' DETERMINAÇÃO DO INDICE DELTA

CORTE TRANSVERSAL



VISTA LATERAL



DETALHE MOSTRANDO O CURSOR

6 (Ur)-Uremia -Grs. por mil.–

7 (K).– Constante de Isaberi–

8 (±δ).– Desvio do indice normal (I)

9

10 Escala 3 redereda proporcionalmente.–

11

Formulas que se usam na resolução numerica dos 3 problemas:–
(K) com factor peso: $\log K = \log Ur - \frac{2}{3}[\log 0{,}016 + \log I + \frac{3}{2}\log C - \log P + \log T]$
(K) sem factor peso: $\log K = \log Ur - \frac{2}{3}[\log 0{,}2280 + \log V + \frac{3}{2}\log C - \log T]$
(I) indice de Fic Lean: $\log I = \log 0{,}2280 + \log V + \frac{3}{2}\log C - (\log T + \log P + 2\log Ur)$
(±δ) resulta de: δ = I – 100.

(C) Concentração da ureá na urina.–Grs. por mil.–

CUADRO COMPARATIVO DE LAS RELACIONES EXISTENTES ENTRE LOS TRES SISTEMAS: CONSTANTE DE AMBARD, INDICE DE MC LEAN E INDICE DELTA.

K. de AMBARD 2 log. K = log. 0,64 − log. I	Indice de Mc LEAN I = δ + 100	Indice Delta δ = I − 100
0,04000	400	+ 300 por ciento
0,04618	300	+ 200 « «
0,05059	250	+ 150 « «
0,05656	200	+ 100 « «
0,05803	190	+ 90 « «
0,05962	180	+ 80 « «
0,06135	170	+ 70 « «
0,06324	160	+ 60 « «
0,06532	150	+ 50 « «
0,06761	140	+ 40 « «
0,07016	130	+ 30 « «
0,07302	120	+ 20 « «
0,07627	110	+ 10 « «
0,07960	101	+ 1 « «
—0,08000	100	—0— « «
0,08040	99	— 1 « «
0,08432	90	— 0 « «
0,08944	80	— 20 « «
0,09561	70	— 30 « «
0,10328	60	— 40 « «
0,11310	50	— 50 « «
0,12649	40	— 60 « «
0,14450	30	— 70 « «
0,17889	20	— 80 « «
0,25268	10	— 90 « «
0,26667	9	— 91 « «
0,28284	8	— 92 « «
0,30240	7	— 93 « «
0,32660	6	— 94 « «
0,43778	5	— 95 « «
0,40000	4	— 96 « «
0,46193	3	— 97 « «
0,50000	2,6	— 97,4 « «
0,56569	2	— 98 « «
0,80000	1	— 99 « «

NOTA:—Para buscar el Indice de Mc LEAN, conocida la Constante de AMBARD, la formula es: log. I = log. 0,64 — 2 log. K.

Note about experimental yellow fever (*)

By ARISTIDES MARQUES DA CUNHA, M. D., and JULIO MUNIZ, M. D.

In a previous note, we had given a report about experimental transmission of yellow fever to the *Macacus Rhesus*, which we obtained starting from a case of the disease under treatment at the Hospital of the Oswaldo Cruz Institute.

We collected by this opportunity a few observations about the evolution of the disease in those animals, specially with reference to the fever and the lesions produced in the liver.

After issuing our former note, we had an opportunity to inoculate some *Rhesus* with African strain and were thus enabled to compare the effect of this virus with that of the virus isolated by us in Rio de Janeiro. As a fact, the duration of the illness in *Rhesus* inoculated with the Brazilian strain used by us, would vary from 5 to 11 days.

In a *Macacus cynomolgus* of our series, it lasted for 14 days. We do not include in this account the very special case of the *Rhesus n. 20*, which happened to die 36 days after being inoculated and whose liver, examined histo-pathologically, revealed the characteristical lesions caused by yellow fever. We must state, the animal had been inoculated with a mixture of liver and citrated plasma from a *Rhesus* which died from yellow fever, the plasma having been submitted to warming at 55°C. for 30 minutes, with a view to destroy the *virus* that it contained.

Our purpose in making this experiment was to verify the existence in the plasma of anti-bodies, during the terminal stage of the infection.

We are of the opinion that the presence in the serum of protecting substances does not account for the long duration of the illness in *rhesus n. 20*, for, after renewing the experiment in the animal which had received liver and warmed plasma at 55°C, this one died on the 6th day, whereas a witness, infected with liver only, died on the 5th day.

The Brazilian strain, isolated by us, does not determine in every case the death of the animal, and, in such occasions, it is most often uneasy to ascertain whether the animal has been infected or not, which to a certain extent, makes the keeping of the virus in the laboratory rather difficult.

The temperature rise does not always provide accurate indications, for it may be owed to other causes, as we had opportunities to observe. Thus the *Rhesus n. 43*, after having been stung by *Aedes* which had priorly sucked a monkey infected with yellow fever, and having shown the same thermic curve as seen in infected animals, (3rd day 40.5° – 4th day 35.2°) died on the 4th day in hypothermy, showing during the stage prior to collapse, the position generally observed in those animals, during the final period of the disease. This notwithstanding, the anatomo-pathological examination revealed only the presence of pneumonia, with no signs of

(*) Read before the Brazilian Society of Biology, December 26, 1928.

yellow fever lesions in the liver, a result which was confirmed by inoculating this liver to another *Rhesus*. It must be noted that in this case, like in others, the urine appeared yellow, with a big amount of albumin and casts, as observed in the course of yellow fever infection, which is a statement of how little worth are such signs.

Another fact we observed in the animals infected with the *virus* isolated by us, is the highly varying extent of the lesions in the liver. In some animals, there was an extended necrosis with destruction of the greatest part of the hepatic cells; some others would show no necrosis, but only changes in the nuclear structure, a fact being that, in one case (*Rhesus 19*) the anatomo-pathological examination did not reveal anything abnormal in the liver, in spite of this having proved infectant when inoculated to another animal.

The African strain with which we worked, contrarily to that isolated by us, determined the death of all the inoculated animals, in a delay from 4 to 6 days, the same showing lesions in the liver, almost always to a large extent, though we used for the inoculations, much smaller doses than those experimented with Brazilian virus.

From all we stated here above, we must draw the conclusion that though the Brazilian virus isolated by us shows of lesser virulence than the African strain, this is not its most characteristical property, as at times, it is sufficient to cause rapid death in the animal, with extended lesions of the liver, as happens with the African strain. Its variable virulence is the more typical property, this determining the longer or shorter duration of the disease, the not always fatal process, as also the variation of extension observed in the lesions of the liver. This property of the virus we worked on, could be accounted for a weaker adaptableness of this to the organism of the *Rhesus*, so that, through successive passages into this animal, this property might be modified, thus acquiring the virus the same characteristical properties of the African strain. But, remaining within the results of our own series of experiments, we do not feel justified in thinking in this way, because what we reached at was to observe alternating grades of virulence, not a progressive increase of same as was expected.

In view of the occurrence with *Rhesus·19,* which, being killed on the 5th day of the illness, showed no lesions in the liver, in spite of being infected as proved by further inoculations, we tried to verify whether the missing of hepatic lesions was constant at a certain stage of the disease, or only to be observed exceptionally and ascribed to the varying virulence of the virus. Two *Rhesus* inoculated with African strain, were killed, one on the 14th day, 3 days after the fever appeared, the other one on the 3rd day, just after the first sign of thermic rise. The histo-pathological examination showed in both, lesions of the liver, with less extended necrosis in the second animal, in which prevailed nuclear changes (oxychromatic degeneration, chromatolyse). This shows that the missing of hepatic lesions is in no way characteristic of the illness, but a fact which may arise in certain cases, and seems to be dependent on the variable infectiousness of the virus, as we point out here above.

NOTE—The African virus with which we worked was supplied to us by Dr. HENRIQUE ARAGÃO, to whom we present our best thanks.

Contribuição preliminar á systematica dos nematodeos dos arthropodos.

Pelo Dr LAURO TRAVASSOS.

A systematica dos nematodeos dos arthropodos é ainda bastante confusa, carecendo da attenção de estudiosos pacientes. Estes nematodeos têm sido sempre estudados de modo fragmentario, sem nunca ter sido feito delles um estudo de conjuncto. Recentemente, entre nós, dois moços de intelligencia privilegiadissima—J. SCHWENCK e P. ARTIGAS—iniciaram estes estudos, infelizmente, porém, foram elles desviados para occupações menos idealistas, não obstante, produziram interessantissimas contribuições e fizeram varias pesquizas que ficaram lamentavelmente incompletas e inéditas. Procuramos na nota presente aproveitar o material destas pesquizas com o objectivo de fazer um estudo mostrando as relações existentes entre os diversos grupos. E' tambem nosso objectivo corrigir erros nossos, relativos á systematica destes nematodeos, publicados em nossa chave geral em 1919. Ha tambem a corrigir um erro de SCHWENCK relativo ao estabelecimento de um novo genero.

E' de vantagem o bom conhecimento dos nematodeos parasitos de invertebrados para a systematica geral dos nematodeos dos vertebrados e só por elles se poderá chegar ao conhecimento das origens phylogeneticas destes parasitos.

Na chave que publicámos, em 1919, separámos os nematodeos (1) dos arthropodos em duas familias : *Lepidonemidae* e *Isakidae* do modo seguinte :

Lepidonemidae.

Lepidoneminae.

Lepidonema.
Aorurus.
Thelastoma.
Pseudonimus.

Hystrignathinae.

Hystrignatus.
Streptogaster.
Heth.

Isakidae.

Isakis.

(1) Referimo-nos aqui apenas dos nematodeos considerados exclusiva e definitivamente parasitos de arthropodos.

A origem do desdobramento de *Lepidonemidae* foi um equivoco que fez considerarmos *Carnoya* GILSON, 1898, identico a *Hystrignathus*, desse modo nossa familia *Hystrignathinae* era baseada em *Carnoya*.

Verificou ARTIGAS que *Hystrignathus* é muito proximo de *Lepidonema* e que *Xyo* COBB é igual a *Hystrignathus*.

Deste modo a subfamilia *Hystrignathinae* TRAV., 1919, não tem razão de ser. Por outro lado julgamos que *Lepidonema* e os generos vizinhos constituem um grupo bastante caracteristico e isolado, notavel sobre tudo pelo systema copulador no qual os orgãos de intromissão são substituidos por dispositivos que permittem apenas uma superposição das aberturas genitaes.

Quanto aos outros generos,—que gruparemos em torno de *Thelastoma* e se caracterisam pela presença de apparelho espicular intromissivel, simples ou duplo,—julgamos dever reunir em familia a parte, dividida em diversas subfamilias de accordo com a estructura do esophago. Aliás parece ter sido esta a orientação de DIESING, em 1861, fazendo a sua familia *Ptycocephalidea*. Naturalmente esta divisão é baseada numa serie de factos que só um estudo longo viria apoiar e que na presente publicação não é possivel fazer. Temos a registrar algumas synonimias genericas verificadas por SCHWENCK e ARTIGAS e ainda ineditas. Assim SCHWENCK verificou ter errado no estabelecimento do genero *Bulhõesia* que corresponde exactamente a *Thelastoma*, por outro lado verificou dever estabelecer para o *Oxyurus blatae-orientalis* um novo genero, isto é, que a especie que corresponde a *Thelastoma* é *O. bulhõesi* e não *O. blastae-orientalis*, devendo este e não aquelle ser separado em genero a parte, a que denomina *Leidynema* n. g. (2).

Verificou ARTIGAS que *Blattophila* COBB 1920, corresponde a *Aorurus* LEIDY e que *Streptogaster* COBB, 1898, corresponde á forma macho de *Heth* COBB, 1898.

Quanto aos *Isakidae*, embora constituam um problema de nomenclatura a discutir, consideramos como grupo a parte, com 3 generos bem caracteristicos e distinctos pela estructura do esophago, onde existe um bulbo posterior ligado directamente ao esophago anterior rijo e chitinoso, isto é, o esophago é como que constituido pelos dois bulbos sem existir a porção intermediaria.

Restam ainda os generos *Cephalobium* COBB, 1920, *Cephallobellus* COBB, 1920 e *Phanoglene* NORDMANN, 1840 cuja situação para nós é ainda incerta.

Resumiremos o referido acima na seguinte chave:

I) LEPIDONEMIDAE TRAV., 1919.

Lepidoneminae TRAV. 1919 (subfamilia unica).

(Syn.: *Hystrignathinae* TRAV. 1919).

Lepidonema COBB, 1898, com duas especies.

bifurcata COBB, 1898.
tarda ARTIGAS, 1928.

---

(2) SCHWENCK foi induzido a este erro pelo livro de BAYLIS & DAUBNEY, 1926.

Hystrignathus LEIDY, 1850, com onze especies:

(Syn.: *Xyo* COBB, 1898).

rigidus LEIDY, 1850.
histrix (COBB, 1898).
leidyi ARTIGAS, 1926.
longicollis ARTIGAS, 1926.
elegans ARTIGAS, 1926.
vesiculosus ARTIGAS, 1926.
hoehnei ARTIGAS, 1926.
similis ARTIGAS, 1926.
longicauda ARTIGAS, 1926.
inermis ARTIGAS, 1926.
politus ARTIGAS, 1928.

Pulchrocephala TRAVASSOS, 1925, com uma especie.

pulchrocephala TRAV. 1925.

THELASTOMIDAE n. fam.

Thelastominae n. subfam. com um só espiculo e sem ventosa preanal, nem bulbo anterior no esophago.
Thelastoma LEIDY 1849, com as seguintes especies:

(Syn.: *Bulhõesia* SCHWENCK, 1926).

attenatum LEIDY, 1849.
bulhõesi (MAGALHÃES, 1900).
magalhãesi (SCHWENCK, 1926).
icemi (SCHWENCK, 1926).

Alem destas temos a referir para este genero, embora com duvidas, as seguintes:

gryllotalpae (DUFOUR, 1837).
gracile (HAMMERSCHMIDT, 1838).
depressum (HAMMERSCHMIDT, 1838).
leuckarti (HAMMERSCHMIDT, 1838).
dilatatum (HAMMERSCHMIDT, 1847).
laticollis (HAMMERSCHMIDT, 1847).
robustum LEIDY, 1850.
labiatum LEIDY, 1850.
socialis (LEIDY, 1850).
brevicaudatum LEIDY, 1851.
glomeridis (v. LINSTOW, 1855).
panesthiae (GALEB, 1878).
heterogamiae (GALEB, 1878).
lanceolata (v. LINSTOW, 1883).
ovocostata (v. LINSTOW, 1886).
longicaudata MEYER, 1896.
pachyjuli (PARONA, 1896).
alatum JOHNSTON, 1914.
leidyi (SCHRJABIN, 1816).

Leidynema SCHWENCK, n. gen. (3), com uma só especie.

(Syn.: *Thelastoma* pr. part.)

blattae-orientalis (HAMMERSCHMIDT, 1847).

Severianoia (SCHWENCK, 1926) com duas especies. (Este genero foi referido como sub-genero mas julgamos dever dar-lhe valor generico).

severianoi SCHWENCK, 1926.
dubia n. sp. (4). (Fig. 1 a 5).

Blatticola SCHWENCK, 1926, com duas especies:

blatticola (GALEB, 1878).
aegyptiaca (GALEB, 1878).

Binema TRAV. 1925, com duas especies:

binema TRAV. 1925.
ornata TRAV. 1925.

Protrellus COBB, 1920, com as seguintes especies:

aureus COBB, 1920.
künkelli (GALEB, 1878.
galebi SCHWENCK, 1926.
australasiae (PESSOA & CORREA, 1927). (5)

Pseudonymus DIESING, 1857 (6), com as seguintes especies:

---

(3) Este genero caracteriza-se pela presença de um diverticulo intestinal em fundo de sacco, delle poderemos dar a seguinte diagnose:

Thelostominae: esophago sem bulbo ou dilatação anterior; com grande dimorphismo sexual e com um diverticulo intestinal permeavel ás substancias alimenticias e dirigido de diante para atraz. Esp. typo: *L. blattae-orientalis* (HAMMERSCHMIDT, 1847).

(4) Esta especie é extremamente proxima de *S. severianoi*. Infelizmente ainda não foi possivel estudar os machos. Notamos pequenas, mas constantes, differenças morphologicas além da differença do hospedador. Quanto ao hospedador não julgamos argumento forte pois não obstante serem de grupos zoologicos muito diversos têm o mesmo *habitat*; consideramos como especie até melhor verificação.

Diagnose: Femea. Comprimimento 1,9 a 2,3 mm; largura 0,15 a 0,2 mm; Cuticula estriada. Poro excretor abaixo do esophago; annel nervoso á cerca de 0,2 mm. da extremidade anterior. Bocca com pequenos labios de cerca de 0.008 mm; e seguida de capsula buccal de cerca de 0,008 mm. de profundidade por 0,012 mm. de largura. Esophago cylindrico, com bulbo posterior, mede de comprimento total cerca de 0,49 a 0,52 mm.; bulbo com cerca de 0,08 a 0,10 mm. de diametro. Intestino rectilineo; cauda conica e aguda com cerca de 0,24 a 0,29 mm. de comprimento. Vulva mediana, abaixo do meio do corpo. Ovejector dirigido de traz para diante; uteros divergentes, mas os ovarios convergem para a extremidade anterior de modo a terem o typo prodelpho. Ovos deprimidos em uma das faces e com cristas longitudinaes pouco nitidas, medem cerca de 0,078 mm. de comprimento por 0,032 a 0,35 mm. de maior largura. *Habitat:* Intestino de myriapodo bromelicola (*Julidae*). Este parasito estava no mesmo hospedador que a especie que descreveremos adiante com o nome de *Angra angra*, n. g. & n. sp.

(5) Este genero ainda não está bem caracterizado e a sua validez, bem como a sua situação systematica, julgamos ainda muito duvidosa.

(6) Na descripção desta especie os auctores, certamente por engano, referem a presença de um so ovario.

(Syn. *Ptychocephalus* DIESING, 1861; *Helicotrix* GALEB, 1878).

spirotheca (GYÖRY, 1856).
hydrophili (GALEB, 1878).
hydroi (GALEB, 1878).
hydrobii (GALEB, 1878).

Os generos desta subfamilia, referidos acima, constituem pela abertura do apparelho genital da femea, 3 grupos bem caracteristicos: Assim *Protrellus* tem a vulva muito anterior emquanto *Bratticola* tem-na muito posterior, ficando os outros generos com a vulva mediana.

Aorurinae WALTON, 1927. (7)

Aorurus LEIDY, 1849, com as seguintes especies:

(Syn.: (*Streptostoma*) LEIDY, 1849; *Blattophila* COBB, 1920).

gracilis LEIDY, 1849.
diesingi (HAMMERSICHMIDT, 1838).
sphaerolaimus (COBB, 1920).

Oniscicolinae n. subfam., com dois espiculos e uma ventosa pré-anal; sem bulbo anterior no esophago.

Oniscicola SCHWENCK, 1927, com uma só especie:

oniscicola SCHWENCK, 1927.

Ramsoneminae n. subfam. (8).

Ramsonema ARTIGAS, 1926, com duas especies:

ramsomi ARTIGAS, 1926.
longispicula ARTIGAS, 1926.

Carnoya GILSON, 1898 com duas especies:

vitiensis GILSON, 1898.
piramboia AGTIGAS, 1926.

Rondonema ARTIGAS, 1926, com uma especie:

rondoni ARTIGAS, 1926.

Angra, n. gen. (9) com uma especie.

---

(7) WALTON inclue nesta subfamilia um novo genero *Thelastomoides* que a nosso ver nada tem com *Aorurus*. Esta subfamilia é caracterizada pelo bulbo ou dilatação anterior do esophago que é do typo *Rhabditidae*.

(8) Esta subfamilia corresponde á que tinhamos a intenção de fazer quando erradamente denominámos *Hystriganathinae*. É caracterizada pela estructura do esophago que aprenta dilatação anterior, mas constituida por uma armação chitinosa e rija e movel na cavidade do corpo. Nos machos os espiculos de muitas especies têm tendencia a se fusionarem.

(9) Este genero, proximo de *Rondonema* tem a seguinte diagnose: Cuticula formando 3 azas lateraes ao nivel do esophago; bocca bivalva, seguida de longo vestibulo; esophago com bulbo anterior muito nitido e ellipsoide nas femeas e alongado e pouco nitido nos machos: Apparelho genital femeo didelpho, prodelpho; ovos volumosos; ovejector curto e forte; vulva mediana; espiculos soldados e acompanhados de gubernaculo. Especie typo: *A. angra* n. sp. *Habitat:* Intestino de *Julidae*.

angra n. sp. ([10]) (Fig. 6 a 12).

Heth COBB, 1898, com a especie descripta:

(Syn.: *Streptogaster* BOBB, 1898).

juli COBB, 1898.

(? *Streptogaster papillatus* COBB, 1898).

Cruznema ARTIGAS, 1927 ([11]), com a seguinte especie:

cruznema ARTIGAS, 1927.

ISAKIDAE TRAV. 1919, com 3 generos.

Isakis LESPES, 1856.
Rhigonema COBB, 1898.
Ichthyocephalus ARTIGAS, 1926.

Incertae sedis.

Cephalobium COBB, 1920; *Cephalobellus* COBB, 1920; *Phanoglene* NORDMANN, 1840.

ARTIGAS tem estudos ineditos de especies dos generos *Heth* e *Cephalobium*.

Rio, 26—I—1929.

([10]) Desta especie damos a seguinte diagnose: Comprimento: femeas 3,2 mm.; machos 2,3 mm. Largura: femeas 0,35 mm.; machos 0,21 a 0,24 mm. Cuticula formando pequenas azas lateraes ao nivel da região esophagiana. Estas azas, presentes nas femeas e machos, são em numero de 3 para cada lado e são separadas por pequenos intervallos (fig. 8); a primeira aza termina a cerca de 0,23 mm.; a segunda a 0,29 mm.; e a terceira a 0,35 mm.; nas femeas e nos machos a 0,16 a 0,21 e 0,26 mm. da extremidade anterior. A bocca é bilabiada e dá entrada a um longo vestibulo muito estreito e que nas femeas mede cerca de 0,096 mm. de comprimento por 0,008 mm. de largura e nos machos 0,040 mm. de comprimento por 0,008 mm. de largura. Esophago com um bulbo rijo na porção anterior, muito nitido e ellipsoide nas femeas onde mede cerca de 0,192 por 0,056 mm. alongado e pouco nitido nos machos, medindo cerce de 0,28 a 0,32 mm. de comprimento, sub-cylindrico. Bulbo posterior nitido, com valvula tricuspida de diametro de cerca de 0,10 mm. nas femeas e 0,096 mm. nos machos. O comprimento total do esophago é de cerca de 0,4 mm. nos dois sexos.

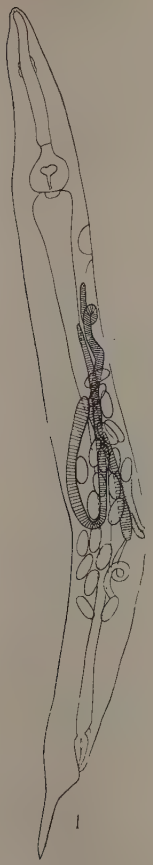
Femeas didelphas, prodelphas, com a vulva situada na porção mediana do corpo á cerca de 1,6 mm., da extremidade posterior, transversal. Ovejector forte, largo e curto, como em *Carnoya* e *Rondonema*. Uteros divergentes, com muitos ovos em morula de 4 cellulas. Ovos muito grandes de casca espessa, medem cerca de 0,136 a 0,156 mm. de comprimento por 0,064 mm, de maior largura. Anus á cerca de 0,5 mm. da extremidade; cauda conica e aguda. Machos com cauda conica e aguda, guarnecida por 6 pares de papilas sesseis sendo 3 pares post-anaes e 3 pré-anaes; os post-anaes são distribuidos do modo seguinte: dois pares proximos, perto da extremidade e um par logo abaixo do anus; do pré-anaes dois são proximos e logo acima do anus e um par ao nivel do meio dos espiculos. Anus á cerca de 0.27 a 0,30 mm. da extremidade posterior. Espiculos medianos, soldados inteiramente de modo a funccionarem como peça unica, são simples, curvos em arco e medem cerca de 0,20 a 0,21 mm. de comprimento. Gubernaculo sub-triangular, quando observado de perfil, mede cerca de 0,10 mm. de comprimento.

Habitat: Intestino de myriapode bromelicola (*Julidae*).

O myriapodo hospedador é encontrado por entre as folhas seccas retidas entre as folhas das bromeliaceas.

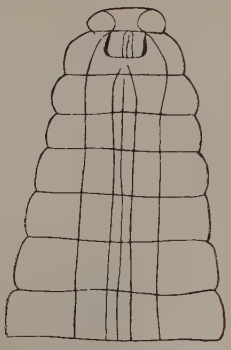
Prov. Angra dos Reis—Estado do Rio.

([11]) Este genero mal conhecido tem uma situação que nos parece ainda duvidosa.



1

2

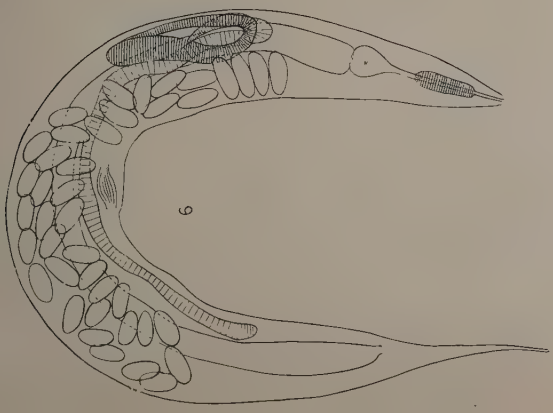


3

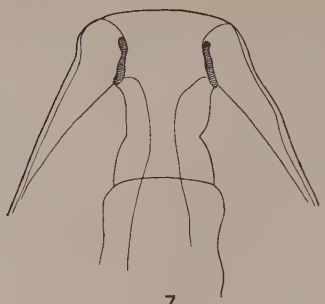
4

5

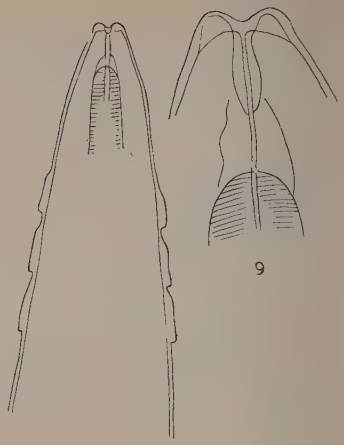
5



6

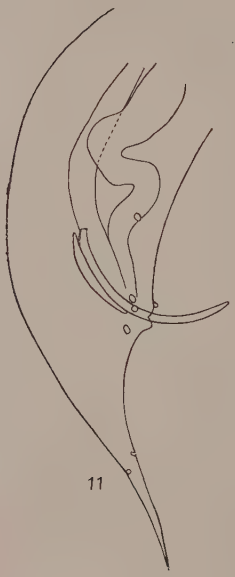


7



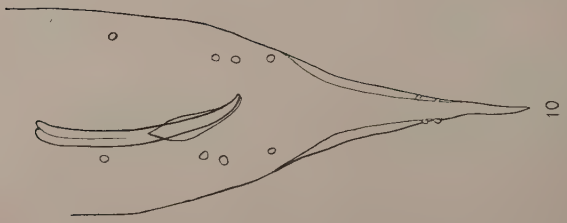
8

9



11

12



10

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS.

Fig. 1 *Severianoia dubia*—total.
« 2 « « —extremidade anterior.
« 3 « « —cabeça.
« 4 « « —cauda.
« 5 « « —ovos de perfil e de frente.
« 6 *Angra angra*—femea total.
« 7 « « — » , cabeça.
» 8 « « —extremidade anterior do macho vendo-se as azas lateraes.
« 9 « « —cabeça do macho.
« 10 « » —cauda do macho de face.
« 11 « « —cauda do macho de perfil.
« 12 « « —espiculos e gubernaculo.

Sobre o encystamento do BALANTIDIUM COLI

(Nota preliminar)

Pelos Drs. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ.

A presente nota visa descrever, de maneira succinta, o processo de encystamento do *Balantidium coli* e os phenomenos que o acompanham.

Dentro em breve publicaremos um trabalho mais detalhado sobre o assumpto, com a respectiva documentação.

Admitte-se presentemente que o encystamento do *Balantidium coli* seja um phenomeno de simples defesa contra as condições desfavoraveis do meio em que vive, não soffrendo o protozoario, no interior do cysto, nenhuma alteração apparente da sua morphologia interna. Além disso BRUMPT admitte um processo differente no qual se dá o encystamento dos dois conjugantes, sem dar, porém, maiores detalhes desse phenomeno.

Sem pretender negar as duas modalidades acima citadas de encystamento, no ciliado em questão, descreveremos aqui um outro processo que tivemos occasião de observar muito bem, na maioria de suas phases, quando estudavamos uma intensa infecção produzida por *Balantidium coli* em dois *Macacus rhesus* que tinham sido utilizados em nossos estudos sobre a febre amarella.

De passagem diremos aqui que grande numero dos *rhesus*, importados pelo nosso Instituto, apresentavam-se parasitados pelo *Balantidium coli* bem como por outros protozoarios como sejam: *Chilomastix*, *Trichomonas*, *Entamoebas* e por um *Octomitus* que é agora assignalado pela primeira vez parasitando animaes dessa especie. A esse *Octomitus*, demos o nome de *Octomitus pitheci* cuja descripção será dada em outra nota.

O primeiro material em que observámos formas de cystos de *Balantidium*, essas eram muito abundantes e uma vez coradas, grande numero dellas mostravam no seu interior dois nucleos arredondados, e portanto differentes dos cystos figurados nos trabalhos de HARTMANN, de DOBELL e O'CONNOR e considerados como cystos de resistencia.

Desde então, examinando diariamente fézes de dois dos nossos macacos que se mostravam intensamente parasitados por esse ciliado (*rhesus* ns. 5 e 6) conseguimos surprehender o inicio do processo de encystamento. Desde esse momento, procedemos á colheita de todas as dejecções logo após a sua emissão. Isso feito durante dias seguidos nos permittiu obter a seriação do material, sendo de notar que o espaço entre algumas dejecções, era, ás vezes, sómente de horas.

O estudo desse material é que nos permittiu esclarecer o processo de encystamento do *Balantidium*, na maioria de suas phases.

As nossas pesquizas foram feitas não só no material a fresco como em preparações fixadas e coradas. Como fixador utilizámos, com optimos resultados, o sublimado-alcool de SCHAUDINN, a frio, e tanto a fixação como a coloração eram feitas em *massa*. Como coloração utilizámos das

hematoxylinas de DELAFIELD e de HEIDENHAIN, do borax carmim e da reacção nucleal de FEULGEN. Este ultimo processo nos prestou relavantes serviços, corando-se os cystos perfeitamente bem por elle.

Durante o periodo de nossa observação, verificámos duas vezes o phenomeno de encystamento no *rhesus* n. 5. Quando isso se dava, as formas vegetativas que eram abundantes no material, diminuiam grandemente de numero para deixarem predominar as formas cysticas (podendo-se contar num preparado de 20 a 30 cystos). Esse phenomeno, como pudemos observar, podia-se dar dentro de 24 horas. Após um ou dois dias de predominancia quasi que exclusiva de formas cysticas, essas eram substituidas por grande numero de formas vegetativas. Esse facto, nos fez suppôr que o desencystamento aqui, se dava no proprio animal, o que aliás veio a ser confirmado pelo estudo do material corado. Antes do encystamento o ciliado parece não soffrer nenhuma modificação visivel na sua extructura. De um modo geral o encystamento passa-se da seguinte forma: o ciliado não se mostra mais dotado de movimentos de progressão, ficando como que fixo num dado ponto, apresentando então intensos movimentos de rotação. Elle se arredonda, dando-se então a formação de uma membrana cystica que, a principio delgada, se mostra depois dotada de um duplo contorno. A estriação assim como o peristoma permanecem, podendo ser observados na maioria dos cystos. O movimento de rotação, que no inicio do encystamento era bastante intenso, vae diminuindo para ser substituido, num dado periodo, por simples correntes plasmaticas e essas mesmas desapparecem completamente nos cystos maduros. O ciliado nem sempre enche totalmente a membrana cystica, podendo-se notar entre elles, espaços claros. Pelo exame a fresco, o cysto apresenta a sua membrana refringente e no seu interior um aspecto granuloso e cheio de inclusões. Tratando-se pelo lugol a preparação, póde-se por em evidencia no interior do cysto, uma grande massa unica ou granulos menores corando-se em pardo escuro ou mais claro e que parecem ser constituidos por glycogenio ou por substancia proxima.

Estudo dos cystos e das formas de evolução nas preparações coradas.— Logo no inicio do processo, o cysto apresenta-se arredondado, com uma membrana não apresentando ainda um duplo contorno, pelo menos em grande numero de exemplares. No seu interior nota-se um macronucleo ainda com o aspecto mais ou menos reniforme, deixando ver no interior delle, em alguns exemplares, um nitido micronucleo. Já aqui observa-se perfeitamente individualizada uma massa de substancia de reserva que pode variar em tamanho. Numa phase mais adiantada vamos encontrar um macronucleo com o aspecto de fuso. Por uma especie de estrangulamento desse fuso, dá-se a formação de dois novos nucleos, que tomam a forma arredondada. O micronucleo tanto nesta phase como na anterior, não póde ser observado, parecendo que elle penetra no macronucleo, e funde-se com elle. Esta ultima forma binucleada representa o cysto maduro e é ella que predomina na phase final do encystamento. Cystos com 4 nucleos pódem ser rarissimamente observados (encontrámos somente 4 vezes essa forma, em todo o nosso material). Pensamos que ella representa forma supernucleada, á semelhança do que occorre com outros protozoarios (*Entamoeba*).

No material em que os cystos vão diminuindo de numero, appare-

cem abundantes formas vegetativas que, ao exame a fresco, se mostram achatadas, alongadas, com o plasma muito claro, de aspecto hyalino e completamente desprovidas de inclusões. Algumas dellas apresentam já inicio de divisão do plasma. Nos preparados corados, essas apresentam 2 nucleos redondos, com a chromatina disposta em granulos muito finos. Essas formas representam sem duvida, individuos que sahiram dos cystos, como demonstram: 1º a coincidencia de seu apparecimento com a diminuição rapida do numero de cystos; 2º por possuirem como os cystos dois nucleos redondos e de estructura semelhante aos d'elles; 3º por não se encontrarem no material formas vegetativas intermediarias entre as de macronucleo, unico, reniforme e as binucleadas.

A essas formas daremos a denominação de formas *metacysticas*.

Os nucleos dessas formas, que se acham a principio distantes um do outro, se approximam, ficando então collocados na parte posterior do ciliado. Aqui começam a apparecer no interior delles, pequenos granulos (3 a 4) cercados de estreitos halos claros. Num estadio mais adiantado, observa-se dentro de cada nucleo um granulo unico, relativamente volumoso, redondo, cercado então por nitido halo claro, e que se cora em muitas formas, mais intensamente na sua peripheria pelo reactivo de FEULGEN. Esses granulos, sem duvida, devem representar o micronucleo de novo individualisado. Nessas formas não se encontram ainda inicio de divisão do plasma. Daqui por deante os dois nucleos se alongam tomando a forma de dois fuzos que se collocam parallelos e a chromatina no interior delles se dispoem em filamentos muito finos dirigidos longitudinalmente. Os micronucleos permanecem com o mesmo aspecto da phase anterior.

Inicia-se agora a divisão do plasma, acompanhada da emigração de um dos fuzos para a parte anterior do ciliado. Completada a divisão do plasma, fica cada individuo com um dos fuzos. Porém, antes da separação completa delles, dá-se a divisão do micronucleo, apresentando-se então cada fuzo que representa o macronucleo em divisão, com 2 micronucleos. Depois dos ciliados estarem completamente separados, dá-se o estrangulamento do macronucleo na parte média, ficando cada uma das partes provenientes dessa divisão com um micronucleo. O estrangulamento e completa divisão do macronucleo são acompanhados de nova divisão do plasma, resultando então de cada cysto, quatro individuos que apresentam todos os caracteres das formas vegetativas do ciliado.

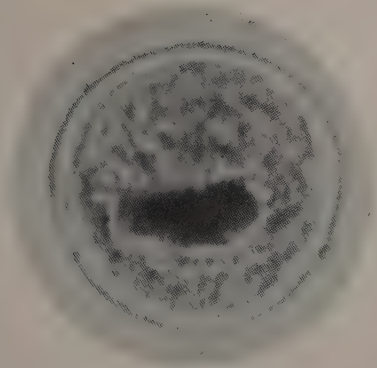
DISCUSSÃO.

Segundo CALKINS os ciliados se encystam com trez fins: 1º para protecção contra as condições desfavoraveis do meio. Nesses cystos o protozoario não apresenta alterações em sua estructura interna. 2º para multiplicação, como acontece com *Colpoda, Tillina*, etc. 3º para reorganisação, como observou FERMOR, na *Stylonychia pustulata*.

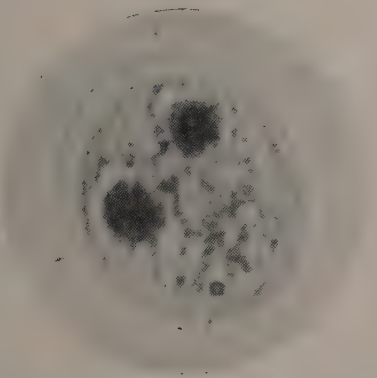
A essas trez modalidades devemos juntar os cystos de conjugação admittidos por BRUMPT no *Balantidium coli*.

Procurando enquadrar em uma dessas formas o phenomeno que observámos, somos forçados a incluil-o entre os cystos de *reorganização*.

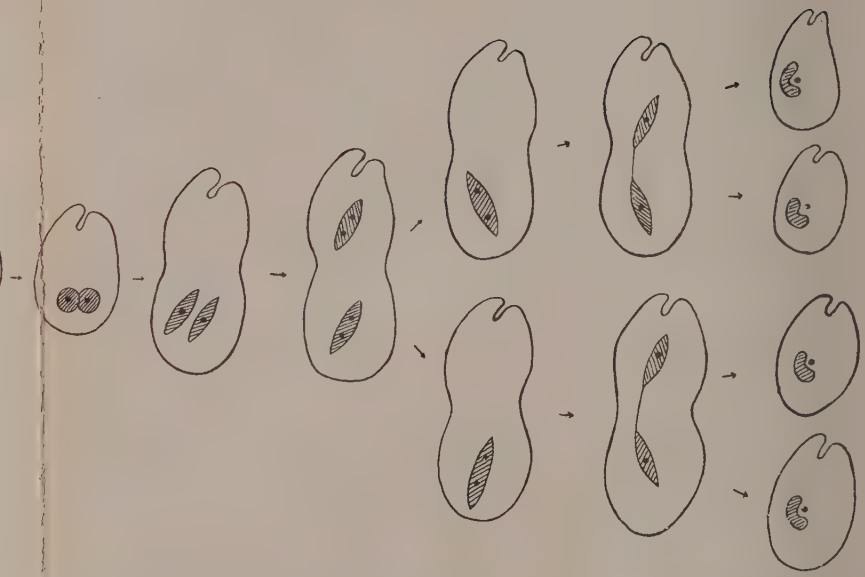
O phenomeno typico de reorganização nuclear é aquelle que se observa no *Paramecium* e que consiste na substituição completa do macronu-



Balantidium coli. Cysto apresentando o nucleo alongado. (Microphotographia).
Balantidium coli. Cyst showing alongated nucleus. (Photomicrograph).



Balantidium coli. Cysto maduro com dois nucleos. (Microphotographia).
Balantidium coli. Ripe cyst with two nuclei. (Photomicrograph).



o do *Balantidium coli* e de suas outras phases de evolução.
of the *Balantidium coli,* and of others phases of its evolution.

cleo que degenera, por um novo, formado á custa do micronucleo. Esse phenomeno é conhecido sob o nome de *endomyxis*. Elle pode coincidir com o processo de encystamento do protozoario, como acontece na *Stylonychia pustulata* (FERMOR) e no *Didinium nasutum* (CALKINS).

O processo por nós observado se afasta em alguns pontos do que occorre nos casos que acabamos de citar. Assim, o macronucleo não degenera, antes, permanece e toma parte em todo o phenomeno. O micronucleo no inicio do encystamento, desapparece, para reapparecer em periodo posterior no interior do macronucleo, perfeitamente individualizado.

E' de crêr que o micronucleo penetre no macronucleo como acontece no *Ichthyophthirius*, rejuvenecendo-o ou pela substituição progressiva de sua chromatina, como NERESHEIMER e BUHCHKIEL admittem para o *Ichthyophthirius* ou levando ao macronucleo novo elemento de que elle carece, para o processo de multiplicação. Julgamos assim andar acertados, approximando o phenomeno que observámos da *endomyxis*, embora se afaste do processo classico por caracteres que lhe são peculiares.

On the Encystment of "BALANTIDIUM COLI"

(Preliminary note)

By ARISTIDES MARQUES DA CUNHA, M. D. and JULIO MUNIZ, M. D.

The present note is intended to give a short description of the process of encystment of *Balantidium coli* and of accompanying phenomena.

We shall shortly publish a more detailed work on the matter with the respective documentation.

It is at present generally admitted that the encystment of *Balantidium coli* is a phenomenon of mere defence against the unfavourable condition of the medium it lives in, the protozoon being subject within the cyst do not apparent change in its internal morphology. Besides, BRUMPT admits a different process in which the encystment of both elements takes place, but does not give more details about this phenomenon.

We do not pretend to refute both processes mentioned hereabove, of the encystment of the ciliata referred to; we shall describe here another process, which we had opportunity to observe throughly, in most of its phases, during our study of a severe infection caused by *Balantidium coli* in two *Macacus rhesus*, of which we made use in the course of our researches on yellow fever.

Incidentally, we have to state here that a great part of the *rhesus*, imported by our Institute, were parasited by *Balantidium coli* as also by other protozoa such as: *Chilomastix*, *Trichomonas*, *Entamoebas* and *Octomitus* here for the first time indicated as a parasite of that kind of monkeys. This *Octomitus* was named by us *Octomitus pitheci*, a description of which will be given in another note.

In the first material in which we observed forms of cysts of *Balantidium coli*, these formed were very abundant, and after being stained, a great part of same, showed inside two round nuclei, thus quite different from the cysts illustrated in HARTMANN's, DOBELL's and O'CONNOR's works, and considered as resistance cysts. Hence, on our daily examination of the faeces of two of our monkeys, which showed strongly infected by these ciliata (*rhesus* ns. 5 and 6) we succeeded in catching the beginning process of encystment. From that moment, we cared for the total gathering of every dejection, at the very moment of its emission. This having been done for a few successive days, enabled us to get series of this material, it being worth mentioning that the time elapsed between some of these dejections was, at times, a few hours only.

From the study of such material, we were able to get an explanation of the encysting process of *Balantidium*, in most of its stages.

Our researches were effected, not morely with living material, but also with fixed and stained preparations. As a fixative, we used successfully, cool sublimate-alcohol of SCHAUDINN, the fixation as also the staining being done in *masses*. Good staining was obtained with DELAFIELD's and

HEIDENHAIN's haematoxylin, borax-carmin and the nucleal reaction of FEULGEN. The latter was of very good service to us, allowing the cysts to get perfectly stained.

During the period of our observation, we verified twice the phenomenon of encystment in *rhesus* n. 5. When this occurred, the vegetative forms, which were before profuse in the material, would greatly decrease in number, and leave the cystic forms to be prominent. (We could find, in a preparation, from 20 to 30 cysts). As we observed, this phenomenon could take place within 24 hours. After one or two days of almost exclusive prominence of the cystic forms, these were replaced by a large number of vegetative forms. This fact induced us to suppose that the disencystment here effected itself even in the animal, which besides happened to be confirmed by the study on stained material. Before the encystment, the ciliata does not appear to undergo visible change whatever in its structure. In general, the encystment seems to occur in the following way: the ciliata lose their translation movements, appearing to be like fixed on a certain point where it then shows intense rotating movements. It becomes round, then appearing a cystic membrane, which showing itself at first thin, has later on a double outline. The striation as well as the peristoma do subsist, and may be observed in most of the cysts. The rotating movement which, at the beginning of the encysting process, was rather intense, goes on decreasing, being replaced, after a given lapse of time, by mere plasmatic currents, which even equally disappear completely in mature cysts. The ciliata does not always fill up completely the cystic membrane; clear spaces may be seen between them. In the examination of fresh material, the cyst shows its membrane to be refractive and having its internal part with a granulous aspect and filled with inclusions. By treating the preparation with lugol, a large single mass can be brought to evidence within the cyst, of also smaller granules, stained in dark grey or still lighter gray the same seeming to consist of glycogen or kindred substance.

Study of the cysts and forms of evolution in stained preparations.— Immediately on beginning the process, the cyst presents itself in a round form, with a membrane in which no double outline yet appears, at least in most of the specimens. Inside it, a macro-nucleus is seen, still with more or less the form of a kidney, in whose interior one may observe, in some specimen, a neat micro-nucleus. In this case also, one clearly sees a perfectly individualized mass of reserve substance which may vary in size. In a more advanced stage, we see a macronucleus with the appearance of a spindle. This spindle, elongates itself becomes narrow in its medium and causes the formation of two new nuclei which affect the round form. Neither at this stage nor at the preceding, is the micro-nucleus to be seen, seeming as if it would penetrate into the macro-nucleus and be mixed up with it. This bi-nuclear form represents the ripe cyst, and is found in large numbers during the final stage of the encystment. Cysts with 4 nuclei are very rarely seen (in all our material, we hardly found such form four times). We believe it represents a super-nuclear form, in the way it occurs with other protozoon (*Entamaeba*).

In the material where cysts go on decreasing in number, there ap-

pear numerous vegetative forms which, on examination in the living condition show themselves flat, lengthened, with plasma very clear, of hyaline aspect and completely deprived from any alimentary inclusions. Some of them show already, the beginning process of plasma division. In stained preparations, these forms show 2 round nuclei with the chromatine disposed in very fine granules. Undoubtedly these forms represent individuals which came out from the cysts, as is demonstrated: 1) by the fact of they appearing accompanied with a very quick decrease of the number of cysts; 2) because they possess, like the cysts, two round nuclei, of the same structure as those of the cysts; 3) in the material, no vegetative forms are to be found, intermediary between those of the macro-nucleus unic kidney-shaped, and the bi-nuclear ones.

To these forms, we shall give the name of *metacystic* forms.

The nuclei of such forms, which are at first separated from another, later on come close together, remaining then placed in the posterior part of the ciliata. There begin to appear inside them small granules (3 to 4) surrounded with clear halos. At a more advanced stage, in each one of the nuclei, a granule is seen, unic, relatively big, round, surrounded then by a neat light halo, which in some specimen may be more deeply stained in its periphery by FEULGEN's reactive. Undoubtedly, these granules should represent the micro-nucleus individualized again. In these forms, no beginning process of plasma division are already to be found. Henceforth, both nuclei become lengthened, affecting the form of two spindles, which take a position parallel to one another, the chromatin in them appearing in very fine filaments disposed lengthway. The micro nuclei keep the same aspect as in the preceding stage.

Then begins the plasma division process, accompained with migration of one of the spindles to the front part of the ciliata. This plasma division being achieved, each individual remains with one of the spindles. Still before the spindles parting completely, there occurs the division of the micro-nucleus, presenting then each spindle, which represents the macronucleus in division, with two micro-nuclei. After the ciliata are completely separated, tken appears the depressing process of the macro-nucleus in its middle part, each of the formed parts of this division containing a micro-nucleus. The depression and subsequent division of the macro-nucleus is accompained by a new division of the plasma, thus resulting from each cyst, 4 individuals which present all the characters of the vegetative forms of the ciliata.

DISCUSSION.

According to CALKINS, the ciliata encyst on three purposes: 1) as a protection against environment unfavourable conditions. In such cysts, the protozoon does not show any change in its internal structure. 2) fo multiplication, as occurs with *Colpoda*, *Tillina*, etc. 3) for reorganization, as observed by FERMOR in *Stylonychia pustulata*.

To these three modalities, we must add the conjugation cysts recognized by BRUMPT in the *Balantidium coli*.

With a view to include into one of these forms the phenomenon we observed, we are compelled to comprise it between the *reorganization*

cysts. The typical phenomenon of nuclear reorganization is the one which is observed in *Paramecium*, consisting of the complete substitution of the macro-nucleus, which degenerates, into a new one, formed at the expense of the micro-nucleus. This phenomenon is known as *endomyxis*. It may coincide with the encysting process of the protozoon, as occurs with *Stylonychia pustulata* (FERMOR) and *Didinium nasutum* (CALKINS).

The process observed by us, is different on some points, from what occurs in the incidences we have just mentioned. Thus, the macro-nucleus does not degenerate, but rather remains subsistent, taking part in the whole phenomenon. The micro-nucleus, at the beginning of the encysting process disappears, reappearing during a later stage, inside the macro-nucleus, and perfectly individualised.

One might believe, the micro-nucleus penetrates into the macro-nucleus, in the way it happens in the case of *Ichthyophthirius*, rejuvenating it, or by the progressive substitution of its chromatin, as NERESHEIMER and BUSCHKIEL admit it to be a fact with *Ichthyophthirius*, or by bringing the macro-nucleus the new element it needs for the process of multiplication.

We are of the opinion that we are nearer to a truth, in admitting a similarity of the phenomenon observed by us with the *endomyxis*, however being rather different from the classical process in some characters peculiar to it.

Nota sobre os parasitas intestinaes do MACACUS RHESUS com a descripção de uma nova especie de OCTOMITUS

Pelos Drs. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA e JULIO MUNIZ.

No curso de nossas pesquizas sobre febre amarella tivemos occasião de trabalhar com um certo numero de *Macacus rhesus* importados pelo Instituto Oswaldo Cruz para esse fim. Como esses animaes frequentemente apresentassem estados dysenteriformes, fomos levados a examinar as suas fézes, verificando então que grande parte delles se apresentava intensamente parasitada por protozoarios intestinaes. O estudo desses parasitas é de grande interesse, por apresentarem alguns delles grande semelhança morphologica com os encontrados no homem. Embora tenham sido descriptos como especie distincta, alguns auctores não os consideraram como taes; entre os que pensam dessa maneira, encontram-se KESSEL e DOBELL que ultimamente se occuparam do assumpto.

Os nossos *rhesus* achavam-se parasitados por protozoarios pertencentes aos seguintes generos: *Entamoeba*, *Trichomonas*, *Chilomastix*, *Octomitus* e *Balantidium*.

A especie do genero *Entamoeba* por nós encontrada, tanto na sua fórma vegetativa como na fórma cystica que possuia 8 nucleos, se assemelhava muito á *Entamoeba coli*, o mesmo se dando com a especie do genero *Chilomastix* que a nós parecem ser identica ao *Chilomastix mesnili*.

Quanto aos flagellados do genero *Trichomonas*, devemos assignalar que, si em alguns animaes por nós examinados elles se assemelhavam á *Trichomonas hominis*, conforme já fora observado por outros pesquizadores, em outros, as *Trichomonas* apresentavam maiores dimensões, membrana ondulante bem desenvolvida, axostylo pouco nitido, não fazendo saliencia para o exterior, como demonstram os dois desenhos que damos, dessa fórma. Achamos que essa ultima fórma se differencia um pouco da *Trichomonas hominis* e da *Trichomonas macacovaginae* descripta por HEGNER em animaes da mesma especie. Tratar-se-há de uma especie distincta? Só um estudo mais aprofundado poderá resolver esta questão.

Parasitos do genero *Octomitus* ainda não haviam sido assignalados em animaes desse grupo e cremos ser nova a especie por nós encontrada.

Octomitus pitheci n. sp.

Flagellado de fórma ovoide medindo de comprimento 2,5 a 3 micra e de largura 1,5 a 2 micra com a extremidade anterior mais larga que a posterior que se mostra afilada. Ao exame a fresco elle se mostra dotado de movimentos muito intensos, atravessando o campo microscopico com grande rapidez o que difficulta a sua observação. Nos preparados corados verifica-se que da extremidade anterior desse flagellado partem 6 flagellos

Trichomonas sp.

Octomitus pitheci.

dispostos em grupo de 3, collocados 1 de cada lado da linha mediana. Esses dois grupos de flagellos se originam de dois pequenos corpusculos basaes dos quaes partem tambem dois axostylos que se dirigem de diante para tráz, para terminarem na extremidade posterior do parasita, dando origem ahi, a dois flagellos caudaes. Dois nucleos de tamanho bastante pequenos, redondos,e de estructura compacta, são encontrados na parte anterior do parasita e dispostos de cada lado do corpo. Esse flagellado é encontrado no intestino grosso do *Macacus rhesus* e quasi sempre em pequeno numero.

Protozoarios do genero *Balantidium* têm sido assignalados nos macacos por varios pesquizadores, como: BROOKS, NOC, BRUMPT, JOYEUX, CHRISTELLER, HEGNER e HOLMES, ZIEMANN e DOBELL. Quasi todos esses auctores são concordes em considerar esse parasita como o *Balantidium coli*. Descrevemos em 1927, no *Cebus caraya*, uma nova especie de *Balantidium* que denominámos de *Balantidium aragãoi*.

O ciliado que observámos agora, no *Macacus rhesus*, apresenta todos os caracteres morphologicos do *Balantidium coli*. As dimensões das suas formas oscillam entre 45 e 78 micra para o comprimento e 32 e 60 micra para a largura. As dimensões medias são, para o comprimento de 63,1 micra e para a largura 48,2 micra. A relação entre o comprimento e a largura é de 1,30, isto é, igual á encontrada por MAC DONNALD para o *Balantidium coli*. O estudo desse material nos convenceu ainda mais de nosso accerto, quando descrevemos como especie independente, a que encontrámos no *Cebus caraya*. Como já tivemos occasião da assignalar, a principal differença morphologica entre as duas especies reside na fórma do macronucleo, que é reniforme no *Balantidium coli* e redondo no *Balantidium aragãoi*. Esse caracter é sem duvida de grande importancia, pois, elle é constante nas fórmas vegetativas de cada uma dessas especies, só deixando de ser observado em certas phases da evolução, quando ambas as especies pódem apresentar macronucleos redondos em numero de dois (fórmas metacysticas no encystamento do *Balantidium coli*, exconjugantes? do *Balantidium aragãoi*).

E' preciso assignalar tambem que esses dois ciliados são encontrados parasitando animaes de especie differente, com condições de vida tambem diversas. Além disso, embora os macacos apresentem muitas vezes parasitos de morphologias semelhantes e mesmo identicas aos do homem, podem em certos casos possuir parasitos que lhes são proprios, como acontece com o *Octomitus* que descrevemos e que não encontra correspondente entre os protozoarios intestinaes do homem. Tambem fallam a favor deste ponto de vista as tentativas que fizemos para infectar *Macacus rhesus*, dando-lhes a ingerir material muito rico em cystos de *Giardia lamblia*, tentativas essas todas com resultado negativo.

Bemerkungen über Darm-Parasiten des MACACUS RHESUS mit Beschreibung einer neuen Art von OCTOMITUS

Von Drs. ARISTIDES MARQUES DA CUNHA und JULIO MUNIZ.

Im Verlauf unserer Untersuchungen über Gelbfieber, hatten wir Gelegenheit mit einer gewissen Anzahl von zu diesem Zwecke von dem Instituten Oswaldo Cruz importirten *Macacus rhesus* zu arbeiten. Diese Tiere pflegten öfters katarrhalischen dysenterieartige Zustände zu zeigen, was uns veranlasste, ihre Faeces zu untersuchen, wobei sich erwies, dass ein grosser Teil derselben stark mit Darmprotozoen infizirt waren. Das Studium dieser Schmarotzer ist von besonderem Interesse, weil einige derselben mit solchen des Menschen eine auffallende Aehnlichkeit zeigen.

Obgleich dieselben als verschiedene Arten beschrieben wurden, wollen einzelne Autoren diese Verschiedenheit nicht zugeben. Unter denjenigen, die diese Auschauung teilen, sind KESSEL und DOBELL, anzuführen, die sich neulich mit dieser Frage befasst haben.

Unsere *Rhesus* zeigten sich mit Protozoen folgender Gattungen infizirt: *Entamaeba*, *Trichomonas*, *Chilomastix*, *Octomitus* und *Balantidium*.

Die von uns sowohl in ihrem vegetativen, wie in ihrer 8 Kerne aufweisenden cystischen Form entdeckte und der Gattung *Entamaeba* angehörige Art, gleicht der *Entamaeba coli* sehr. Auch die der Gattung *Chilomastix* angehörige Art, scheint uns mit *Chilomastix mesnili* identisch.

Was die Flagellaten der Gattung *Trichomonas* anbelangt, so müssen wir feststellen dass, wenn dieselben, in einzelnen von uns untersuchten Affen, wie schon von anderen Forschern beobachtet, mit den *Trichomonas hominis* eine Verwandschaft zeigen, die *Trichomonas* bei anderen grössere Dimensionen, eine gut entwickelte undulierende Membran und einen nicht ganz deutlichen, nach aussen nicht hervorragenden Axostyl zeigten, wie aus unseren beiden Zeichnungen dieser Form ersichtlich ist. Wir sind der Meinung, dass diese letztere Form von dem *Trichomonas hominis*, und dem von HEGNER, in einigen Affen derselben Art beschriebenen *Trichomonas macacovaginae*, etwa abweicht. Ob es sich um eine ganz getrennte Art handelkann diese Frage nur durch ein genaures Studium entschieden werden.

Parasiten der Gattung *Octomitus* wurden noch von Affen nicht bekannt gegeben. Wir glauben daher, dass die von uns entdeckte Art neu sei.

Octomitus pitheci n. sp.

Ovoides Flagellat. mit 2,5–3 mikra Länge und 1,5–2 mikra Breite; das Vorderende ist breiter als das hintere, das zugespitzt erscheint. Bei Untersuchung von frischem Material zeigt dasselbe intensive Beweglichkeit und durchkreuzt das Gesichtfeld mit grosser Geschwindigkeit, was dessen

Beobachtung sehr erschwert. In gefärbten Präparaten ersieht man an dem Vorderende 6 Geisseln in dreizähligen Gruppen, von denen eine auf jeder Seite der Mittellinie steht. Diese beiden Flagellatengruppen entspringen aus zwei kleinen Basalkörperchen, von denen auch zwei Axostyle nach rückwärts, verlaufen um am Hinterende des Parasiten auf zuhoeren, wo aus denselben zwei caudale Geisseln entspringen. Zwei ziemlich kleine, runde, und mehr kompakt und an den Seiten des Körpers gelegene Kerne, sind im vordern Teile des Parasiten zu erkennen. Dieses Flagellat findet man im Dickdarm des *Macacus rhesus*, fast immer nur in geringer Zahl.

Protozoen der Gattung *Balantidium* wurden von verschiedenen Forschern wie BROOKS, NOC, BRUMPT, JOYEUX, CHRISTELLER, HEGNER und HOLMES, ZIEMANN und DOBELL, in Affen angegeben. Fast alle genannte Autoren sind einig, diesen Parasiten als *Balantidium coli* zu betrachten. Im Jahre 1927 beschrieben wir aus *Cebus caraya*, eine neue Art von *Balantidium*, die wir *Balantidium aragãoi* benannten.

Die Ciliaten, die wir jetzt bei *Macacus rhesus* beobachten, weisen sämmtliche morphologische Charakteren des *Balantidium coli* auf. Die Dimensionen dieser Formen liegen zwischen 45 und 78 Mikra Länge und 32 bis 60 Breite. Diese Masse betragen durchschnittlich für die Länge 63,1 und für die Breite 48,2 Mikra. Das Verhältniss zwischen Länge und Breite ist 1,30, d. h. genau was MAC DONNALD für das *Balantidium coli* beobachtete. Das Studium dieses Materials bestätigt durchaus die Richtigkeit unserer auffassung indem wir die von uns in *Cebus caraya* gefundene Art als eine selbständige beschrieben. Wie wir bereits Gelegenheit fanden hervorzuheben, besteht der hauptsächlichste morphologische Unterschied zwischen den beiden Arten in der Form des Makronukleus, das, bei *Balantidium coli* nierenförmig, und im *Balantidium aragãoi* rund ist. Diese Eigentümlichkeit ist zweifelsohne von grosser Wichtigkeit, da sie sich in den vegetativen Formen jeder dieser Arten, beständig erweist. Erst in einzelnen Evolutionstadien ist sie nicht vorzufinden, und ersieht man alsdann in beiden Arten zwei runde Makronuklei (metacystische Formen bei der Eincystirung des *Balantidium coli*, exconjugante bei *Balantidium aragãoi*).

Es muss auch erwähnt werden, dass beide Ciliaten Schmarotzer von verschiedenartigen Tieren mit verschiedenen Lebensbedingungen auch sind. Wenn übrigens die Affen auch oftmals Parasiten aufweisen, die eine ähnliche und sogar übereinstimmende Morphologie zeigen, wie diejenigen im Menschen, können dieselben in anderen Fällen ganz eigene Parasitenarten beherbergen, wie dies bei dem hier beschriebenen *Octomitus* der Fall ist. Dasselbe entspricht keinem der Darmprotozoen des Menschen. Ausserdem wird diese unsere Ansicht durch von uns unternommene Experimente befestigt, bei denen bei *Macacus rhesus* von cystenreichem Material von *Giardia lamblia*, verfüttert wurde. Diese Versuche blieben vollstaendig erfolglos.

Do funccionamento renal na febre amarella, na convalescença e após a cura

Por J. CASTRO TEIXEIRA (do Hospital Oswaldo Cruz)

Durante o surto de Febre Amarella, no segundo semestre de 1928, praticámos algumas provas de funccionamento renal em doentes internados no Hospital Oswaldo Cruz, sendo 4 casos na convalescença e 5 após a cura da molestia.

Para mais facil interpretação, reunimos os nossos resultados em graphicos e os illustrámos com as curvas de temperatura, pulso e tensão arterial (methodo auscultatorio). Relacionámos os dias de prova com o regimem alimentar e o dia de molestia.

METHODOS EMPREGADOS

Prova de diluição e de concentração: empregámos o methodo de VIOLLE combinado com o de VOLHARD. Estando o doente em jejum e em equilibrio chloretado, administram-se 800 c.c. de agua ou chá, em fracções de 200 c.c. de meia em meia hora, a partir de 8 horas, momento em que se faz o doente urinar. Em seguida colhem-se as urinas de meia em meia hora até ás 11 horas, verificando em cada porção o volume e a densidade. E tambem pelo resto do dia, em tempo mais espaçado, isto é, ás 13, 17, 20 e 8 horas do dia seguinte, e o doente fica em dieta secca.

Prova de chloretos e de uréa: Procura-se antes um equilibrio chloretado e azotado e submette-se o doente ao mesmo regimem alimentar durante os dias de prova. A dieta 3ª a que se referem os graphicos é achloretada; a 4ª hypoazotada e a 5ª normal. No 1º dia de prova, o doente urina ás 8 horas e despreza-se esta micção; depois, urina ás 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 8 horas do dia immediato. Constitue este o *typo normal*. No 2º dia colhem-se as urinas como acima e ministram-se 10 grs. de chloreto de sodio em capsulas ou junto com os alimentos da 1ª refeição, ás 11 horas. No 3º dia repete-se o typo normal e no 4º dia colhem-se as urinas como nos dias anteriores e ministram-se 20 grs. de uréa, em xarope, ás 10 horas. Em cada fracção de urina, medem-se volume e densidade, dozam-se os chloretos e a uréa, pesquiza-se albumina e pratica-se o exame microscopico.

Prova colorimetrica: Empregámos a prova da phenolsulfophtaleina, em injecção intramuscular de 0,005 gr. e dosámos a eliminação pelo colorimetro de HELLIGE.

Prova de hydrophilia: Technica de ALDRICH e MC CLUREL: injecção intradermica, na perna, de 0,25 c.c. de solução de NaCl 0,85 %.

Os doentes observados na convalescença, 3 casos, (graphicos 1, 2 e 4) foram de forma benigna e de signaes renaes pouco notaveis. Houve 1 caso grave (graphico 3) em que foi sensivel o ataque ao rim, existindo

na urina, por muitos dias, grande quantidade de albumina e abundancia de cylindros, principalmente granulosos, e cellulas renaes.

O graphico n. 1 mostra uma má eliminação de agua, incapacidade de diluição, capacidade de concentração e eliminação satisfactoria do chloreto e da uréa de próva. A próva de ALDRICH e MC CLUREL revelou uma tendencia dos tecidos á hydrophilia.

O graphico n. 2 indica um retardamento na eliminação da agua, regular capacidade de diluição, capacidade de concentração e eliminação quasi total do chloreto e da uréa de prova.

Graphico n. 3. As provas foram feitas na convalescença, que foi muito prolongada e, como vimos, o rim foi muito atacado. Revela uma má eliminação dagua, capacidade de diluição e de concentração, má eliminação do chloreto e da uréa de prova.

Graphico n. 4. Retardamento na eliminação da agua, boa capacidade de diluição de concentração, eliminação completa do chloreto e da uréa de próva. A próva de ALDRICH e MC CLUREL foi de 46 minutos.

Os doentes estudados após cura (graphicos ns. 5, 6, 7, 8 e 9) foram de formas mais graves e nelles o exame da urina revelou, por muitos dias, grande quantidade de albumina, abundancia de cylindros granulosos e epitheliaes e cellulas renaes, principalmente no doente do graphico n. 8.

A eliminação da agua foi normal, os rins mostraram capacidade de diluição e de concentração, menos no caso n. 8 em que estas funcções estiveram diminuidas e aquella retardada.

A uréa de próva foi eliminada e quanto ao chloreto de próva houve retenção quasi total em 2 casos (graphicos 5 e 8).

CONCLUSÕES

1) Os doentes observados na convalescença eram, na sua maior parte, da fórma benigna.

2) Os doentes observados após a cura eram casos da fórma grave.

3) Na convalescença as próvas para o funccionamente renal revelaram um retardamento na eliminação da agua, perturbação na diluição e capacidade de concentração. Eliminação boa do chloreto e da uréa de próva.

4) Após a cura, pelas próvas feitas, verificámos que os rins eliminam normalmente a agua, tem capacidade de diluição e de concentração e eliminam o chloreto e a uréa de próva.

5) A próva de ALDRICH e MC CLUREL, feita em 4 casos, revelou uma pequena tendencia dos tecidos á hydrophilia.

Graphicos	1	3	8	4	Normal
Test	46'	37'	45'	46'	60'

6) A prova de phenolsulfophtaleina, na convalescença, deu uma eliminação, em media, de 45,2 %, na 1ª hora.

Graphico	1	2	3	4	Normal
Eliminação 1ª h.	47 o/o	42 o/o	40 o/o	52 o/o	65 o/o

7) Pela prova da phenolsulfophtaleina, após a cura, verificámos uma eliminação, em media, de 65 o/o, na 1ª hora.

Graphico	9	8	6	Normal
Eliminação 1ª h.	57 o'o	70 o/o	68 o/o	65 o/o

8) Pelos resultados obtidos, parece-nos que a reparação das funcções renaes, de diluição e concentração, de eliminação de chloreto, de uréa e da phenolsulfophtaleina se faz rapida e completamente, na febre amarella.

BIBLIOGRAPHIA.

1) MC CLUREL e ALDRICH—The intradermical salt solution test, Jour. Am. Med. Ass., Maio de 1924.
2) LITHSWITZ—Enfermedades del riñon—Trad. 1926.
3) VOLHARD—Enfermedades del riñon—Trad. hespanhola 1922.
4) MARCEL LABBE' et VIOLLE—Métabolisme de l'eau. 1927.
5) PENIDO, J. C.—Supp. Memorias Inst. Oswaldo Cruz, Out. 1928. Observações sobre alguns elementos da urina na Febre Amarella.

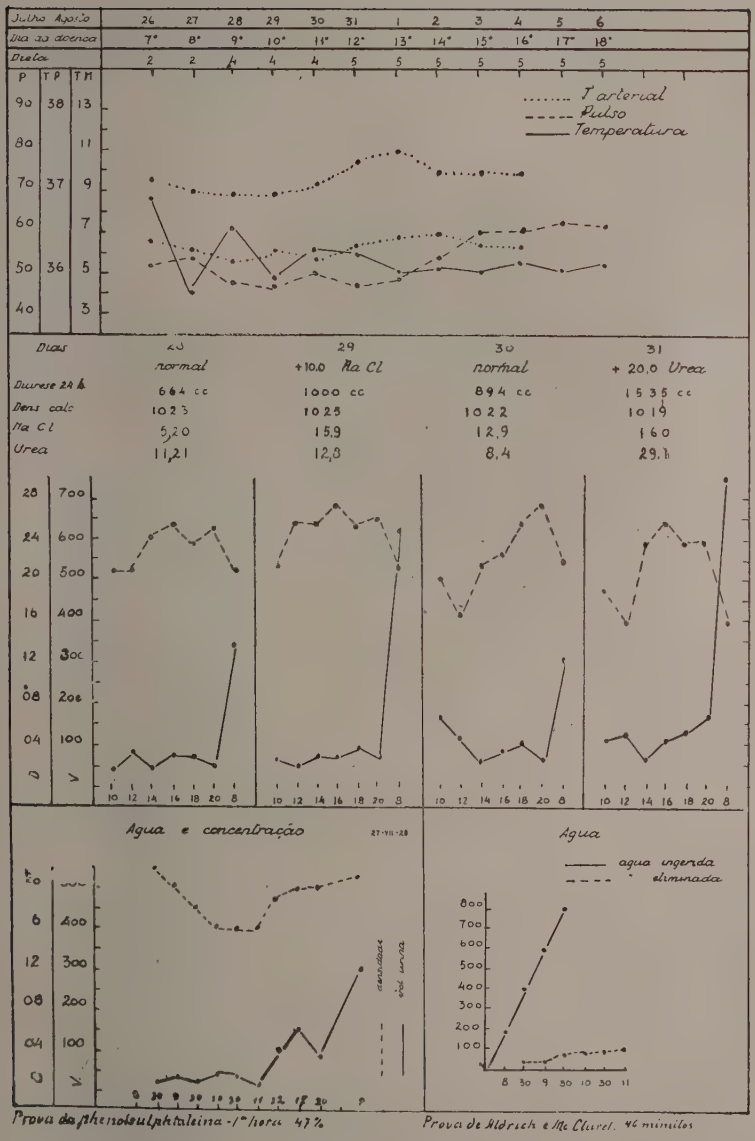
RESUMO DAS OBSERVAÇÕES

Graphico n. 1—A. S. C., Reg. 169 A., 22 annos, branco, portuguez. Inicio com cephalalgia, mal estar e vomitos. Ao ser internado sentia grande abatimento, olhos injectados, ictericia bem nitida da esclerotica. Baço crescido. Dôr epigastrica. Bulhas cardiacas abafadas. Exame da urina: grande quantidade de albumina, cylindros granulosos, urobilina. Até o 13º dia continuou com grande adynamia. Até o 8º dia de molestia tinha cylindros na urina, persistindo depois traços de albumina.

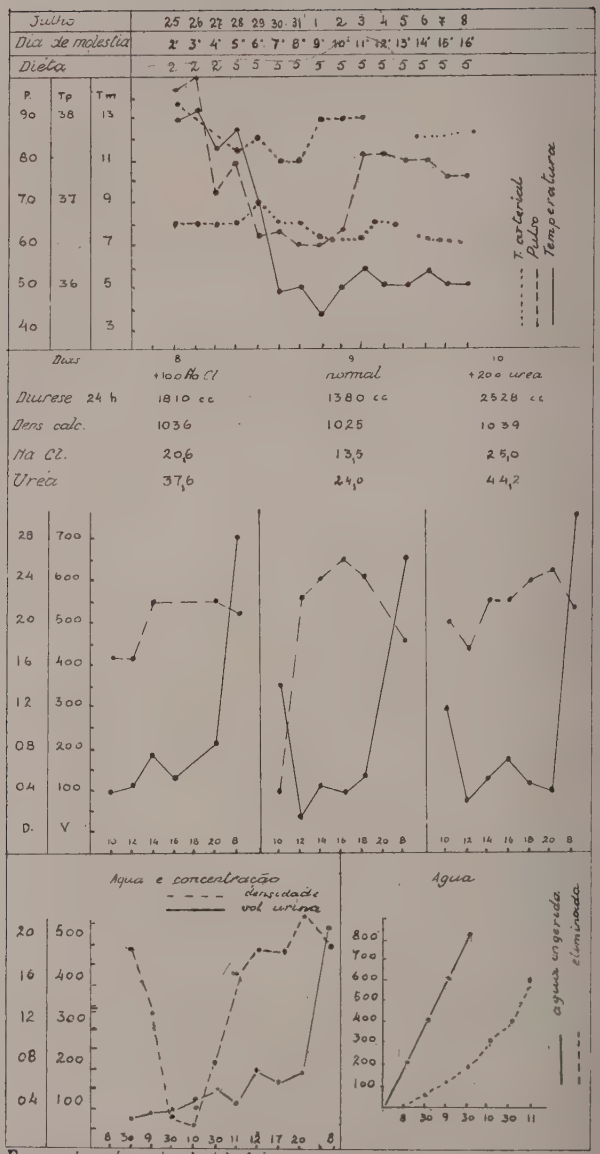
Graphico n. 2—S. I. Reg. 829, 10 annos, branco, brasileiro. Adoeceu com dores musculares, fraqueza nos membros inferiores e peso na cabeça. Ao internar-se apresentava olhos brilhantes e injectados, e vaso dilatação peripherica. Baço augmentado. Durante 3 dias teve cylindros na urina e traços de albumina.

Graphico n. 3—I. D., Reg. 853, 14 annos, branco, russo. Inicio com cephalalgia, dores lombares e temperatura elevada. Ansiedade e dôres epigastricas. Vomitos de "borra de café" desde o 2º dia de molestia. Grande prostração, olhos brilhantes, sub-ictericia. Exame da urina, ao entrar: Grande quantidade de albumina, cylindros granulosos e epitheliaes e cellulas renaes. O estado do doente aggravou-se até o 7º dia de molestia, tendo dias de delirio. A ictericia augmentou progressivamente. Os signaes urinarios melhoraram depois do 16º dia.

Graphico n. 4—F. W., Reg. 165 A., 12 annos, branco, hungaro. Cephalalgia, fortes dores lombares, mau estar, vomitos e oppressão epigas-

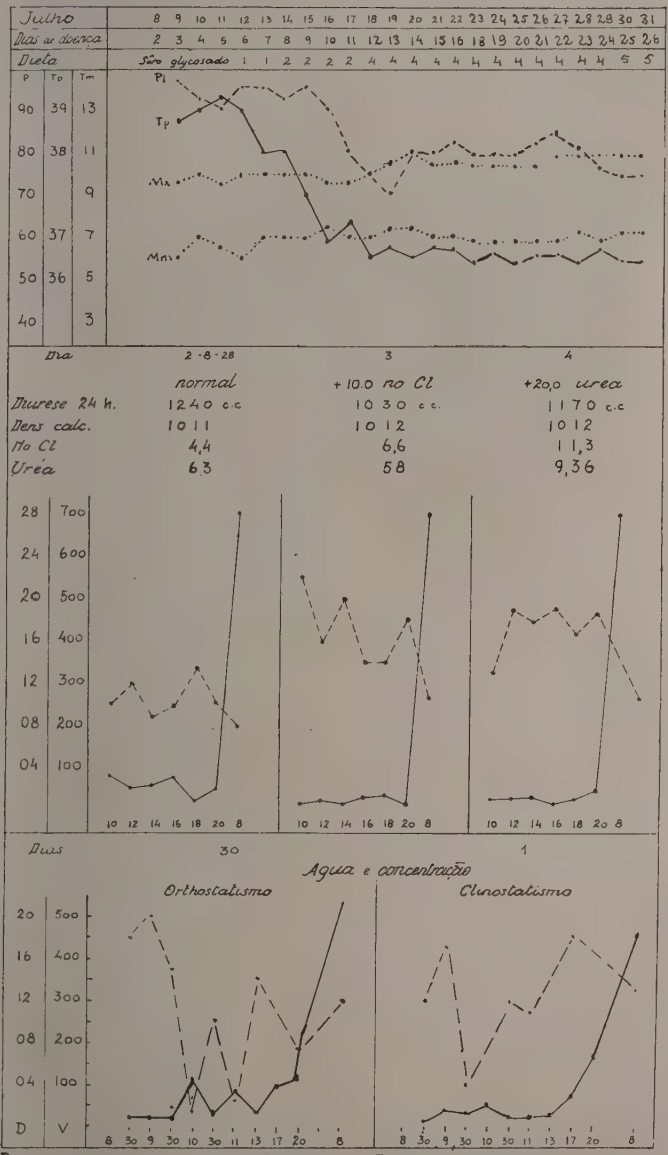

Julho Agosto
Dia da doença
Dieta
T arterial
Pulso
Temperatura
Dias
normal
+10,0 Na Cl
normal
+ 20,0 Urea
Diurese 24 h
Dens calc
Na Cl
Urea
664 cc
1000 cc
894 cc
1535 cc
1023
1025
1022
1019
5,20
15,9
12,9
1,60
11,21
12,3
8,4
29,1
Agua e concentração
Agua
agua ingerida
eliminada
Prova da phenolsulphtaleina - 1ª hora 47%
Prova de Aldrich e Mc Clurel. 46 minutos

Graphico n. 1



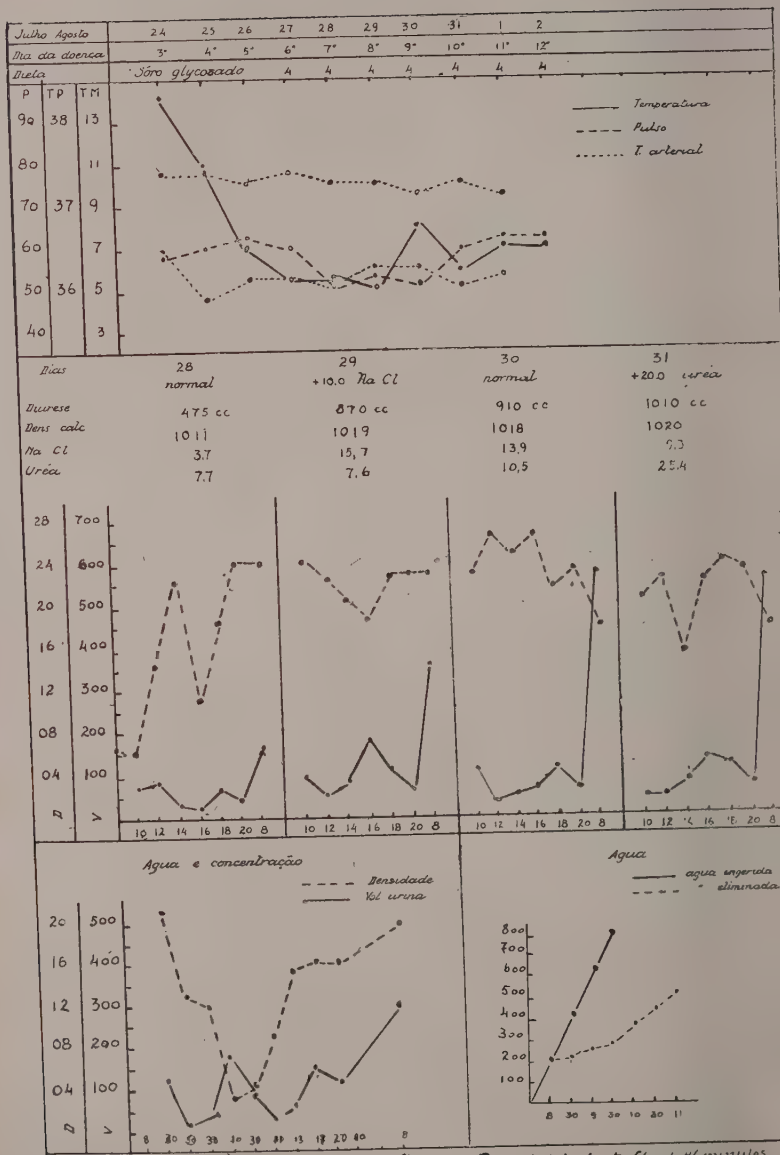
Prova da phenolsulphtaleina-1ª hora: 42%

Graphico n. 2

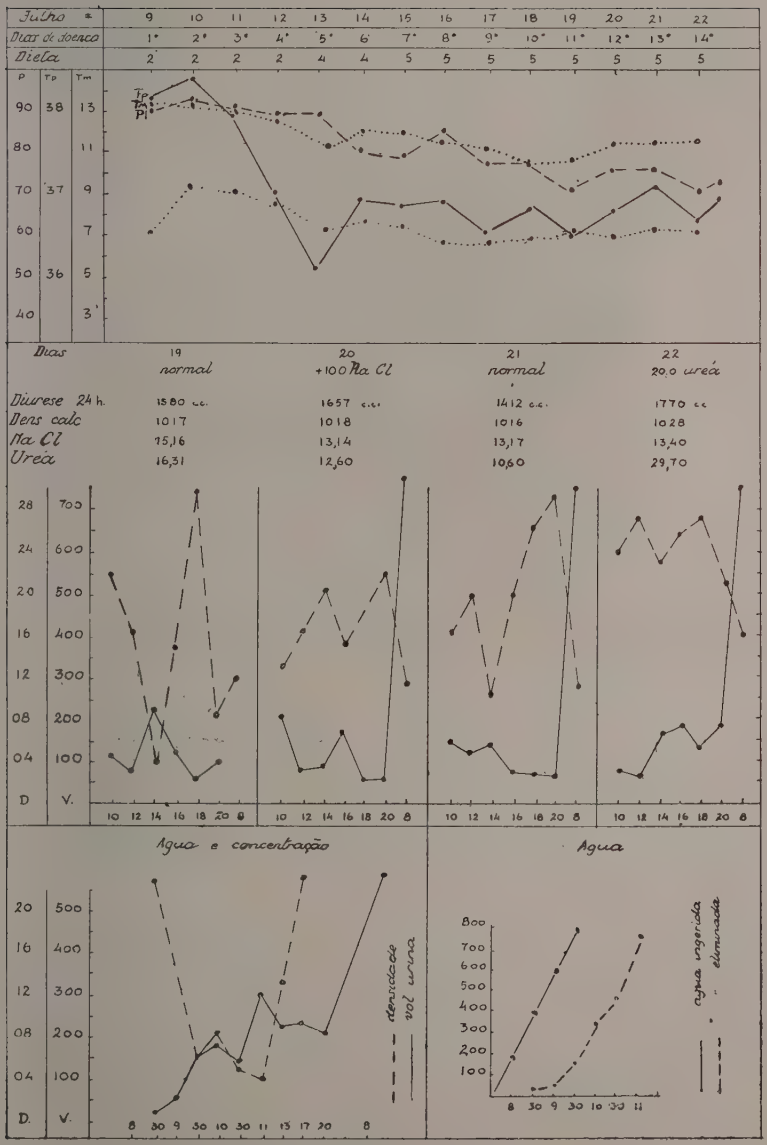


Prova da phenolsulphtaleina – 1ª hora: 40 %. *Prova de Mehrich e McClurel 37 minutos.*

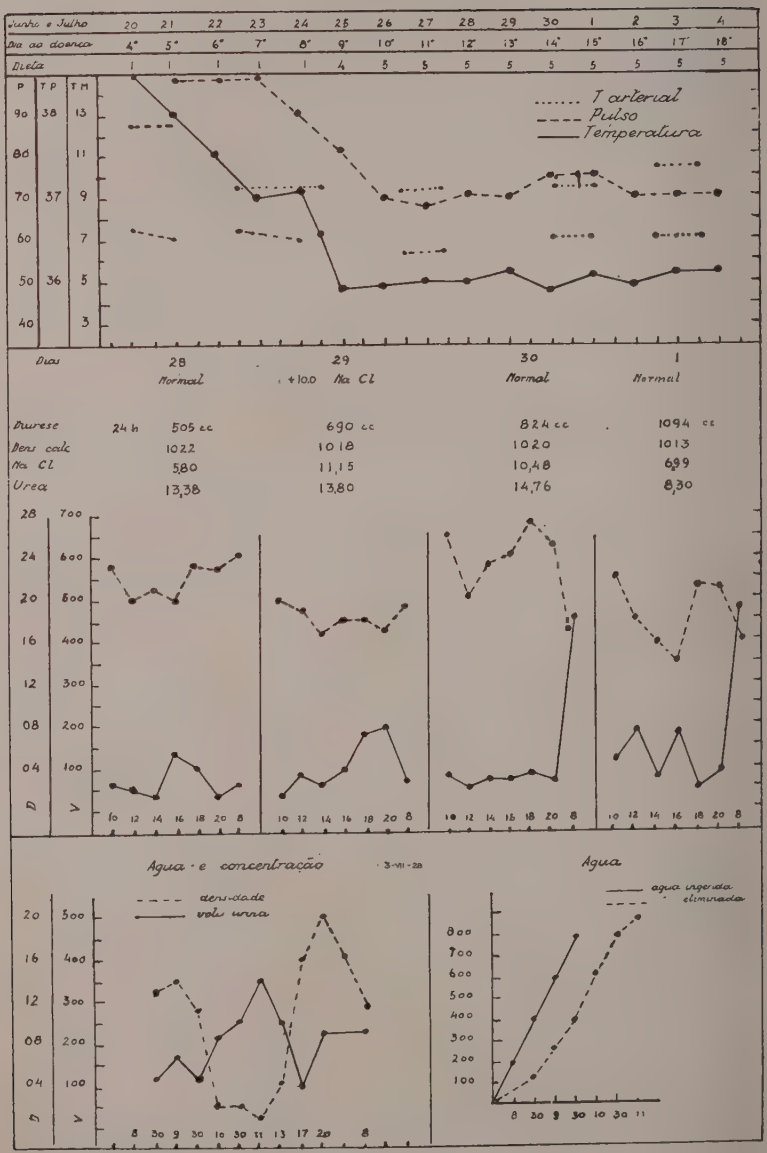
Graphico n. 3


Julho Agosto
Dia da doença
Dieta
Soro glycosado
Temperatura
Pulso
T. arterial
Dias
28 normal
29 +10.0 Na Cl
30 normal
31 +20.0 ureia
Diurese
Dens calc
Na Cl
Ureia
475 cc
1011
3.7
7.7
870 cc
1019
15,7
7.6
910 cc
1018
13.9
10,5
1010 cc
1020
25.4
Agua e concentração
Densidade
Vol urina
Agua
agua ingerida
eliminada
Prova da phenolsulphtaleina - 1ª hora 62 %
Prova de Ehrlich e Mc Clurel 46 miligrammas

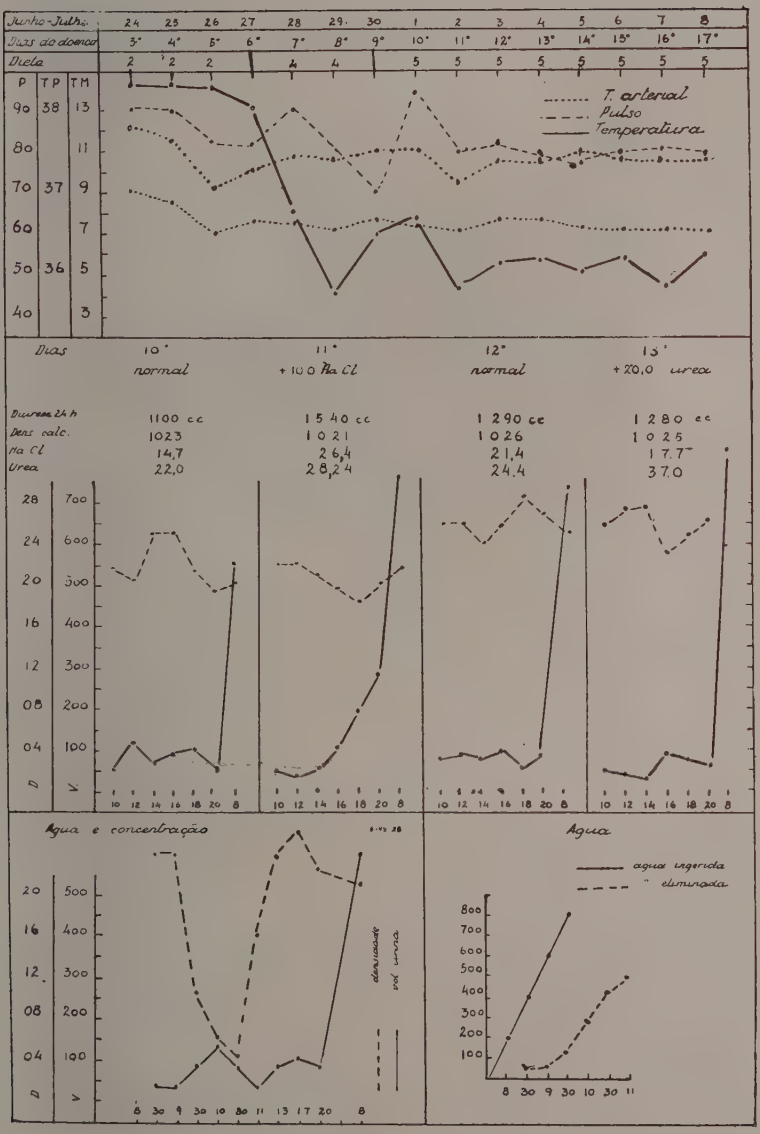
Graphico n. 4


Julho
Dias de doença
Dieta
P
Td
Tm
Tp
Td
Pl
Dias
19 normal
20 +100 Na Cl
21 normal
22 20,0 ureá
Diurese 24 h.
1580 cc.
1657 cc.
1412 cc.
1770 cc
Dens calc
1017
1018
1016
1028
Na Cl
15,16
13,14
13,17
13,40
Uréa
16,31
12,60
10,60
29,70
D
V.
Agua e concentração
densidade
vol urina
Agua
agua ingerida
eliminada

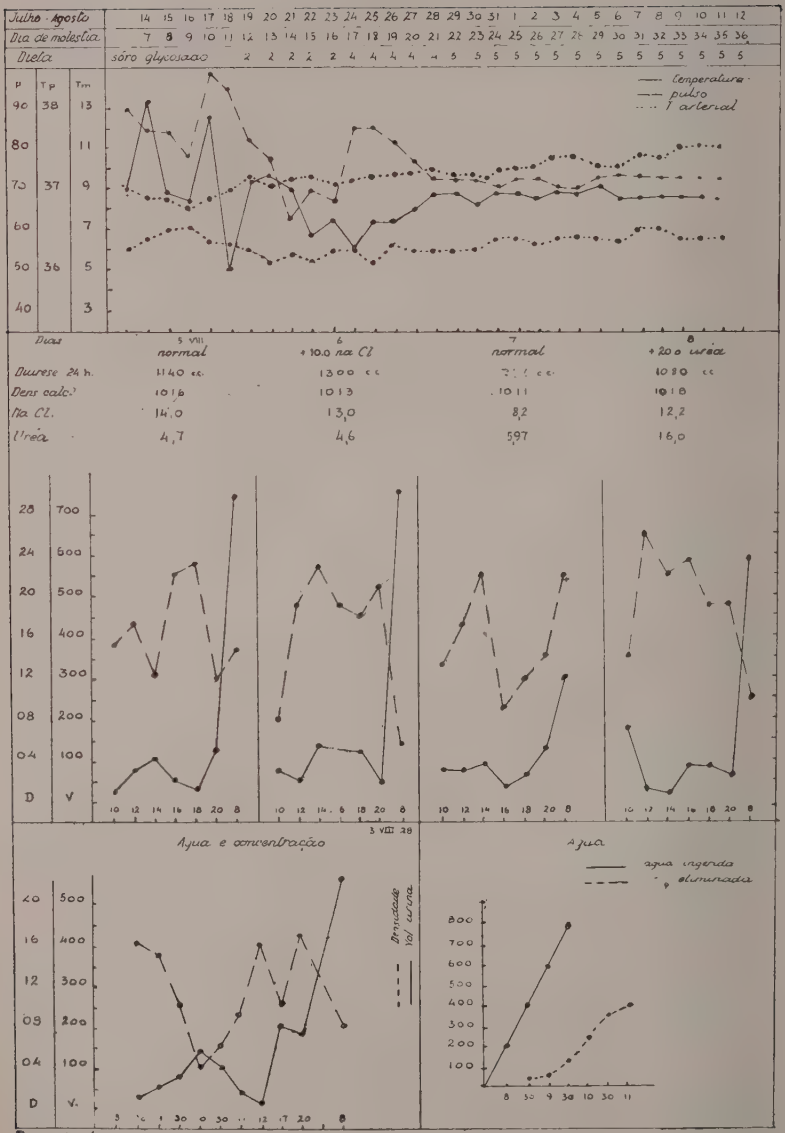
Graphico n. 5


Junho e Julho
Dia da doença
Dieta
T arterial
Pulso
Temperatura
Dias
Normal
+10,0 Na Cl
Normal
Normal
Diurese
Dens calc
Na Cl
Urea
Agua e concentração
densidade
volu urina
Agua
agua ingerida
eliminada
Prova da phtaleina - 1ª hora - 60%

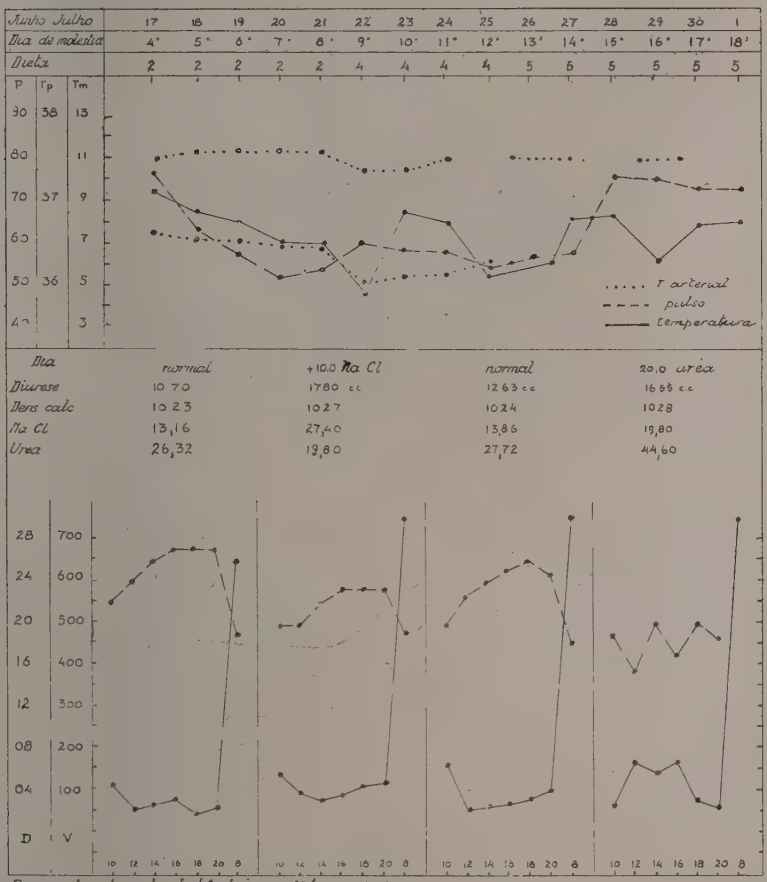
Graphico n. 6


Junho-Julho
Dias da doença
Dieta
P TP TM
T. arterial
Pulso
Temperatura
Dias
10° normal
11° + 10,0 Na Cl
12° normal
13° + 20,0 urea
Diurese 24 h
Dens. calc.
Na Cl
Urea
1100 cc
1023
14,7
22,0
1540 cc
1021
26,4
28,24
1290 cc
1026
21,4
24.4
1280 cc
1025
17.7
37.0
Agua e concentração
densidade
vol. urina
Agua
agua ingerida
" eliminada

Graphico n. 7


Julho · Agosto
Dia de molestia
Dieta
soro glycosado
temperatura
pulso
T arterial
Dias
normal
+ 10.0 na Cl
normal
+ 20.0 ureia
Diurese 24 h.
Dens calc.
Na Cl.
Ureia
Agua e concentração
densidade
vol urina
Agua
agua ingerida
% eliminada
Prova da phenolsulphaleina - 1ª hora: 70% 10-8-1928
Prova de Aldrich e Mc Clure 48 minutos

Graphico n. 8


Junho Julho
Dia de moléstia
Dieta
P
Rp
Tm
T arterial
pulso
temperatura
Dia
normal
+10,0 Na Cl
normal
20,0 uréa
Diurese 10 70 1780 cc 12 63 cc 16 55 cc
Ders calc 10 23 10 27 10 24 10 28
Na Cl 13,16 27,40 13,86 19,80
Urea 26,32 13,80 27,72 44,60
D
V
Prova da phenolsulphtaleina - 1ª hora : 57 %
3 - VII - 928

Graphico n. 9

trica. Grande prostração, rubor da face, vaso-dilatação peripherica. Face vultuosa. Depois de internado teve vomitos pretos. Os cylindros desapparereram depois do 8º dia e a albumina no 10º.

Graphico n. 5—A. H. M., Reg. 824, 22 annos, branco, portuguez. Adoeceu com cephalalgia, dores lombares, calafrio e elevação thermica. Face vultuosa, olhos injectados. Albumina e cylindros na urina por muitos dias. Ictericia desde o 4º dia.

Graphico n. 6—Y. P., Reg. 824, 15 annos, branca, brasileira. Calafrios e elevação thermica. Cephalalgia e grande mal estar. Vomitos de "borra de café" desde o 4º dia. Nos primeiros dias os symptomas se aggravaram. Cylindruria até o 6º dia de molestia, restando traços de albumina.

Graphico n. 7—M. M., Reg. 829, 28 annos, branco, portuguez. Inicio com calafrios, febre, cephalalgia e dores lombares. Ao internar-se apresentava grande prostração, rubor da face, olhos brilhantes e injectados. Lingua humida com muita saburra. A urina revelou grande quantidade de albumina e cylindros granulosos. Os signaes renaes duraram até o 16º dia. Não teve vomitos. Icterica intensa.

Graphico n. 8—A. S. S., Reg. 868, 18 annos, pardo, brasileiro. Internado em estado de confusão mental. Adynamia com grande apathia. Mucosas labiaes sangrando á pressão. Leve ictericia. Pequeno edema das palpebras. Baço palpavel. Oliguria. Grande quantidade de albumina e abundancia de cylindros granulosos e epitheliaes e cellulas renaes. Sómente depois de 10º dia de hospitalização foi que as melhoras se accentuaram e nesse dia desappareceram os cylindros. Traços de albumina.

Graphico n. 9—A. A. F., Reg. 821, 19 annos, branco portuguez. Cephalalgia, rachialgia, adynamia. Face vultuosa. Suffusões sanguineas nos labios. As mucosas do nariz, gengivas e labios sangraram por muitos dias. Urina: grande quantidade de albumina, cylindros granulosos e epitheliaes e cellulas renaes, tendo este signaes desapparecido depois do 10º dia. Ictericia muito accentuada.

Sunccional test of kidney in Yellow Sever during convalescence and after treatment

By J. CASTRO TEIXEIRA (From Oswaldo Cruz Hospital)

During the outbreak of yellow fever in the course of the second half of the year 1928, we realized a few tests about renal function on patients under treatment at the Oswaldo Cruz Hospital, four of whom were convalescent, and other five completely cured from the disease.

For a clearer understanding, we assembled our results into graphics illustrated with thermic curves, pulse and arterial strain records (auscultatory method). We stated the dates of tests, together with the dietetic regimen and the stage day of the illness.

METHODS USED

Tests of Dilution and Concentration.—We applied to VIOLLE's combined with VOLHARD's method. The patient being fasting and in chloride equilibrium, 800 c.c. of water or tea were ministered in parts of 200 c.c. every half hour, from 8 in the morning, which was the time the patient had to discharge urine. Hence urine was gathered every half hour until 11 a. m., the volume and density being verified of each micturition. During the following hours, scarcer examinations were made, taking place at 13, 17, 20 and 8 o'clock of the next morning, the patient remaining then under dry diet.

Cloride and Urea tests.—Prior to anything else, chloride and azote equilibrium had to be obtained, after which the patient was submitted to the same alimentary regimen during the proof days.

Diet the 3rd. referred to in the graphics, is the chloride diet, the 4th being the hypoazotised and the 5th the normal one. On the first day, the patient discharges urine at 8 a. m. which micturition is not taken into account. Afterwards, he urinates at 10, 12, 14, 16, 18 and 20 and 8 o'clock of the next morning, this constituting the *normal type.*--On the second day, urine is collected in the same way and sodium chloride is being given either in capsules or mixed up with the food of the first meal at 11 o'clock. On the third day, the normal type is reproduced, and on the 4th day urine is gathered the same as in the foregoing period, the patient being then given 20 grams. of urea in syrup, at 10 a. m. In each discharge, volume and density are verified, chlorides and urea dosed, albumina looked for and microscopic examination must be made.

Colorimetric test.—We used the phenosulfophtalein test, by way of intramuscular injection of 0,005 gr. and dosed the elimination by the HELLIGE colorimeter.

Hydrophilic test.—By ALDRICH and MAC CLUREL's technic: intradermic injection in the leg, of 0,25 of a NaCl 0,85 o/o solution.

The convalescent patients examined (3 cases) – Graphics 1, 2 and 4 were from a mild form, and with kidney change of no noteworthy extent. There was one severe case (graphic 3) in which the attack to kidney was a serious one, the urine showing for a long series of days, a big quantity of albumin, and abundant, chiefly granulous casts with renal cells.

Graphic 1 shows a wrong elimination of water, no power of dilution, but capacity of concentration, and a satisfactory elimination of the proof chloride and urea, ALDRICH and MAC CLUREL's test reveals a tendency of tissue to hydrophily.

Graphic 2 shows a rather great slowness in water elimination, a regular dilution, and easy concentration power, and an almost complete elimination of the proof chloride and urea.

Graphic 3. The proof were made during convalescence which lasted a long time, hence showing a severely attacked kidney. We observed a wrong water elimination, decrease of dilution and concentration power, a bad elimination of proof chloride and urea.

Graphic 4. A certain slowness of water elimination, fair dilution and concentration capacity, complete elimination of proof chloride and urea doses. ALDRICH and MAC CLUREL's tests lasted for 46 minutes.

The patients examined after being cured (graphics ns. 5, 6, 7, 8 and 9) were of more severe forms. In these, the urines examined revealed for many days a large quantity of albumin, abundance of granulous and epithelial casts and renal cells, specially in the patient of graphic 8.

The water eliminatiou was a normal one kidneys showing dilution and concentration power, except in case n. 8, in which the latter functions were in decrease and the former delayed.

The proof urea was eliminated and with regards to proof chloride, in two cases, (graphics 5 and 8) it was almost totally retained.

CONCLUSIONS

1) The patients examined in convalescent stage were mostly cases of benign form.

2) The patients observed after being cured were cases of severe form.

3) during convalescence, the tests about kidney function, revealed delay in water elimination, disturbance in dilution and concentration power. Fair elimination of chloride and urea proof.

4) After the cure, we verified, from the tests effected that the kidney eliminated water normally, had power of dilution and concentration, and eliminated the proof chloride and urea.

5) The ALDRICH and MAC CLUREL's test, effected in 4 cases, revealed slight tendency of the tissues to hydrophily.

Graphics	1	3	8	4	Normal
Test	46'	37'	45'	46'	60'

6) The Phenolsulfophtalein test showed during convalescence, an average elimination in the first hour of 45,2 %.

Graphics	1	2	3	4	Normal
Elimination 1st hour	47 o/o	42 o/o	40 o/o	52 o/o	65 o/o

7) The same test, after the cure, gave an average of 65 o/o for the elimination during the first hour.

Graphics	9	8	7	Normal
Elimination 1st hour	57 o/o	70 o/o	68 o/o	65 o/o

8) The restoring of renal function, of dilution and concentration power, of chloride, of urea and Phenolsulfophtalein elimination appears to us, in view of the obtained results, as being quick and complete in the Yellow Fever.

LITERATURE

1) MAC CLUREL and ALDRICH – The intradermical salt solution test. Journ. Am. Med. Ass. May 1924.
2) LITHSWITZ – Enfermedades del riñon – Trad. 1926.
3) VOLHARD – Enfermedades del riñon – Trad. Esp. 1922.
4) MARCEL LABBE' et VIOLLE – Métabolisme de l'eau. – 1928.
5) PENIDO, J. C. – Supp. Memorias Inst. Osw. Cruz., Outub. 1928 (Observações sobre alguns elementos da urina na Febre Amarella).

SUMMARY OF CLINICAL RECORDS.

Graphic n. 1 – A. S. G., Reg. 169. A., 22 years, white, Portuguese. Begins with headache, ill feeling and vomiting. On being interned, great faintness, bloodshot eyes, clear jaundiced sclerotic. Spleen enlarged. – Epigastric pain, stifled heart breaths. Urine examination: big quantity of albumin, granulous casts, urobilin. Up to the 13th day, goes on with a great adynamy. Until the 8th day of the illness, there were casts in urine, persisting further traces of albumina.

Graphic n. 2—S. I., Reg. 829, 20 years, white, Brazilian. Felt at first muscular pain, weakness of inferior limbs and a weight in the head. When interned glistening and bloodshot eyes, peripheric vaso-dilatation. Spleen enlarged. During three days, there were casts in urine and also traces of albumina.

Graphic n. 3 – I. D., Reg. 853, 14 years, Russian. Begins with headache, lumbar pain and high temperature. Anxiety and epigastric pain "coffee grounds" vomiting from the second day of the illness. Great prostration, glistening eyes, sub-ictericia. Urine examination on his admission: Great quantity of albumina, granulous and epithelial casts and renal cells. The condition of the patient grew worse until the 7th day of the illness, occurring some days delirium. Ictericia gradually increasing. Signs in urine improving from the 16th day.

Graphic n. 4—F. W. Reg. 165 A., 12 years, Hungarian. Headache, great pain in the back, ill feeling, vomiting and epigastric oppression.

Serious prostration, red face, peripheric vaso-dilatation, turgid face. After being interned, had dark vomiting. Casts disappeared after the 8th day, albumina after 10.

Graphic n. 5—A. H. M., Reg. 824, 22 years, white, Portuguese. Began with headache, lumbar pain, shivering and temperature rise. Turgid face, bloodshot eyes. Albumina and casts in urine for many days. Jaundice from the 4th day.

Graphic n. 6—Y. P. Reg. 824, 15 years, white, Brazilian woman. Shivering and thermic rise. Headache and serious ill feeling. Vomiting of "coffee grounds type" from the 4th day. During the first days, symptoms grew worse. Cylindruria until the 6th day of the illness, remaining traces of albumina.

Graphic n. 7—M. M., Reg. 289, 28 years, white, Portuguese. Begins with shivering, fever, headache and lumbar pain. When interned, great prostration, red face, glistening and bloodshot eyes. Tongue wet and very saburrhal. Urine reveals great quantity of albumina and granulous casts. Renal signs persisting up to the 16th day. There is no vomiting. Intense jaundice.

Graphic n. 8—A. S. S., Reg. 868, 18 years, myxed, Brazilian. Interned in complete state of mental confusion. Adynamy and great apathy. Labial mucosae bleeding under pressure. Slight jaundice. Slight oedema of the eyelids. Spleen palpable.—Oliguria.—Great quantity of albumina and of granulous and epithelial casts and renal cells. Only after 10 days of the internment, the improvement became patent, in which day the casts disappeared. Traces of albumina.

Graphic n. 9—A. A. F., Reg. 821, 19 years, white, Portuguese. Headache, rachialgia, adynamia. Turgid face. Bleeding lips. The nasal, gums and labial mucosae bleeding for many days. Urine: big quantity of albumina, granulous and epithelial casts and renal cells, which signs disappear after the 10th day. Highly accentuated jaundice.

Curso de applicação do Instituto Oswaldo Cruz

1ª. Parte

NOÇÕES PRELIMINARES, IMMUNOLOGIA E BACTERIOLOGIA

1.—Medidas physico-chimicas applicadas á Microbiologia. Calculo dos numeros approximados. Erros das medidas; applicação á contagem das bacterias e dos corpusculos do sangue. 2.—Microscopia, theoria e pratica. Apparelhos accessorios. Fundo escuro; ultra-microscopia. 3.—Technica bacteriologica. Methodos de investigação microscopica. Cultura dos micro-organismos. Reacção dos liquidos organicos e dos meios de cultura. Inoculação e necropsia de animaes. 4.—Morphologia, physiologia, caracteres geraes e classificação das bacterias. 5.—Infecção, resistencia e immunidade em geral. 6.—Toxinas e antitoxinas. Preparo e dosagem dos sôros antitoxicos. 7.—Agglutininas e precipitinas. 8.—Immunolysinas. 9.—Opsoninas e bacteriotropinas. Vaccinas e vaccinotherapia. Preparo dos sôros anti-infecciosos. 10.—Anaphylaxia. 11.—Bacteriophagia. 12—Coccos em geral. Staphylococcos, streptococcos e pneumococcos. 13—Meningococcos e gonococcos. 14.—Diphtheria. 15.—Bacterias do grupo coli-typhico. 16.—Bacillo da febre de Malta. 17.—Bacterias do grupo dysenterico. 18.—Bacterias acido-resistentes. Tuberculose. 19.—Lepra. 20.—Mormo. 21.—Bacterias do grupo hemoglobinophilico. Bacillos de Pfeiffer, de Bordet e de Ducrey. 22.—Bacterias das Septicemias hemorrhagicas. Peste. 23.—Carbunculo hematico. 24.—Anaerobios. Tetano. Botulismo. Gangrenas gazosas. Carbunculo symptomatico. 25—Cholera.

PARTE COMPLEMENTAR.

26.—Theoria geral da inflammação. Processos pathogenicos da natureza infecciosa. 27.—Hematologia. Exame da actividade funccional dos orgãos de secreção.

2ª. Parte

SPIROCHETOS, VIRUS FILTRAVEIS E FORMAS DE SYSTEMATICA INDECISA.

28.—Spirochetoses. Febre recurrente. Syphilis. Bouba. Ulcera tropical. Febre ictero-hemorrhagica e febre amarella. 29.—Molestias produzidas por virus filtraveis e ultramicroscopicos. Raiva. Variola. 30.—Bartonellas e Rickettsias.

3ª. Parte

MYCOLOGIA

31.—Generalidades. Parasitologia em geral. Vida associativa. Taxonomia em geral. Systematica Regras de nomenclatura botanica. 32.—Definição e posição systematica dos cogumelos. Acção pathogenica dos cogumelos. Mycoses em geral. 33.—Biologia dos Actinomycetos. 34.—Actinomycetos parasitos. Actinomycoses em geral. Mycetomas. 35.—Morphologia e

desenvolvimento dos Eumycetos. 36.—Cytologia dos Eumycetos. 37.—Ecologia e physiologia dos Eumycetos. 38.—Phycomycetos em geral. Estudo especial das Mucorineas. 39.—Ascomycetos em geral. 40.—Saccharomycetaceas em geral. Especies parasitas do homem. 41.—Endomycetaceas em geral. Especies parasitas do homem. 42.—Aspergillaceas em geral. Especies pathogenicas. 43.—Estudo geral dos cogumelos imperfeitos. 44.—Estudo geral das tinhas. 45,—Cogumelos parasitos dos pellos. Microsporias e trichophyceas. 46.—Cogumelos parasitos dos pellos. Favo. Piedra. 47.—Cogumelos parasitos da epiderme. Epidermophyceas e endodermophyceas. Pityriases parasitarias. Tinhas chromogenas. 48.—Maduromycoses. Chromoblastomycoses. 49.—Blastomycoses. 50.—Esporotrichoses, hemisporoses e outras mycoses.

PROTOZOOLOGIA

51.—Protozoarios em geral. Morphologia, biologia e systematica. Tachnica protozoologica. 52.—Rhizopodos em geral. Amebas parasitas. 53.—Flagellados em geral. Protomonadinas parasitas. 54.—Trypanosomidas em geral. Trypanosomas e leishmanias. 55.—Sporozoarios em geral. Coccideos, gregarineas e hemosporideos. Parasitas da malaria e piroplasmas. 56.—Cnidosporideos em geral. Myxo e microsporideos. 57.—Protozoarios de posição indeterminada. Toxoplasmas, sarcosporideos e haplosporideos, etc. 58.—Ciliados em geral; especies parasitas.

HELMINTHOLOGIA

59. Introducção. Objecto e importancia da helminthologia. 60.—Technica geral. Technica das autopsias com fins helminthologicos. Colheita dos helminthos. Fixadores, fixação e conservação de nematelminthos, acantocephalos, trematodeos e cestodeos. Pesquiza de ovos de helminthos e methodos de enriquecimento. Culturas. 61.—Trematodeos. Morphologia geral, evolução e systematica dos trematodeos. 62.—Cestodeos. Morphologia geral, evolução, systematica e biologia dos cestodeos parasitos do homem. 63.—Nematelminthos. Morphologia geral, evolução, biologia e systematica dos nematelminthos parasitos do homem. 64.—Hirudineos. Morphologia, evolução e systematica.

ARTHROPODOS PARASITOS E TRANSMISSORES DE MOLESTIAS.

65.—Arachnideos em geral. Ixodideos. 66.—Considerações geraes sobre a classe Hexapoda. 67.—Noções de anatomia externa dos insectos. 68.—Noções de anatomia interna dos insectos e estudo succinto das funcções dos principaes apparelhos. 69.—Desenvolvimento e metamorphoses dos insectos. 70. Classificação geral dos insectos. Principaes regras internacionaes de nomenclatura zoologica. 71.—Importancia da entomologia medica. Como os insectos podem determinar molestias. 72.—Piolhos. 73.—Hematophagos, especialmente: reduvideos da tribu Triatominae e crimicideos. 74.—Dipteros; principaes familias de especies hematophagas da sub-ordem Orthorrhapha, especialmente: psychodideos e culicideos. 75.—Culicideos transmissores de molestias e respectiva ethologia. 76.—Principaes familias da sub-ordem Cyclorrhapa, especialmente: muscideos e sarcophagideos. 77.—Principaes moscas productoras de myiases. 78.—Pulgas; estudo das principaes familias e das especies de maior interesse medico.

ANIMAES VENENOSOS.

79.—Arachnideos e escorpionideos. 80.—Vertebrados: peixes, batrachios e reptis.

Este Curso, que durou de Julho de 1927 a Dezembro de 1928, foi dado pelos seguintes technicos do Instituto:

Chefes de Serviço: Drs. ADOLPHO LUTZ, HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO, JOSÉ GOMES DE FARIA, ANTONIO CARDOSO FONTES e ARISTIDES MARQUES DA CUNHA, e pelos Assistentes: Drs. LAURO TRAVASSOS, OLYMPIO DA FONSECA filho, JOSÉ DA COSTA CRUZ, CARNEIRO FELIPPE, OSWINO PENNA, A. DA COSTA LIMA, H. C. DE SOUZA-ARAUJO, J C. N. PENIDO e JOSÉ G. LACORTE.

Matricularam-se 28 candidatos e terminaram o curso, recebendo diplomas 18, cujos nomes damos abaixo, pela ordem da sua classificação nos exames.

O quintannista de Medicina da Faculdade do Rio de Janeiro, Sr. JOSÉ REIS, foi classificado em 1º logar e conquistou o "Premio OSWALDO CRUZ" (Medalha de Ouro).

LISTA DOS DIPLOMADOS

Estudante JOSÉ REIS, Laureado; Dr. HENRIQUE DE AZEVEDO PENNA; Dr. ALBERTO SIMÃO LEVY; Pharmaceutica LYGIA PINHEIRO BRAVO; Dr. HILDEBRANDO PORTUGAL; Dr. JOSÉ THIERS PINTO; Dr. GERALDO CUNHA PIRES AMORIM; Dr. CARLOS CHRISTO; Dr. JOÃO SADI REZENDE; Estudante JOSÉ CALVINO filho; Dr. JOSÉ SIZENANDO DE MACEDO LEME; Dr. EUGENIO RODRIGUES DE SOUZA; Pharmaceutica AFFONSINA LEITE; Dr. OCTACILIO RAINHO DA SILVA CARNEIRO; Dr. MANOEL JOAQUIM DE SOUZA LEMOS; Dr. LUIS PRADO BARRIENTOS; Dr. JORGE JABOUR e Dr. ALFREDO NOGUEIRA DE CASTRO.

Os respectivos diplomas foram entregues, solemnemente, pelo Director do Instituto, ás 14 horas de 1º de Fevereiro corrente.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

OS DIPLOMADOS DE 1928

Alumnos diplomados no curso de 1928, acompanhados do Prof. CARLOS CHAGAS, director do Instituto.

MONODONTUS RÁRUS, n. sp., novo nematodeo parasito de "MESOMYS GUIARA"

Pelo Dr. LAURO TRAVASSOS.

Vamos descrever um parasito novo de um dos roedores mais raros do Brasil. Só examinámos um exemplar macho; não obstante retardámos a descripção durante muito annos, na esperança de obter outro exemplar do mammifero, o que não foi possivel. Aliás não é de admirar pois trata-se de especie muito rara, conhecida apenas por tres ou quatro exemplares.

Nematodeo de tamanho pequeno com bocca voltada dorsalmente e ampla capsula buccal. Mede de comprimento 4,1 mm; largura 0,38 mm. Cuticula estriada transversalmente; annel nervoso á cerca de 0,28 mm. da extremidade anterior. Bocca conduzindo a uma capsula buccal de 0,088 por 0,080 mm. Esta capsula apresenta ventralmente duas laminas semelhantes ao observado em *Necator* e dorsalmente, no fundo, um dente conico na linha mediana; a entrada do esophago, no fundo da capsula buccal, é guarnecida por quatro saliencias chitinosas agudas e pouco visiveis. O esophago é claviforme, com cerca de 0,26 mm. de comprimento por 0,16 mm. de largura maxima. Bolsa copuladora ampla, funccionando como pinça dorso-ventral, formada pelo lobo dorsal e por um dos lobos lateraes (direito). Tem a seguinte formula de raios bursaes; ventraes com tronco commum; lateral anterior isolado; lateraes medio e posterior com tronco commum (os raios do lobo direito são muito mais fortes que os do lado esquerdo e são implantados um pouco mais atraz); raios dorsaes com tronco commum; raios dorsaes externos nascendo em alturas differentes do dorsal e sendo o direito maior que o esquerdo; dorsal bifurcando-se em ramos de pontas bifidas, o ramo direito mais forte: o comprimento total do raio dorsal é de 0,26 mm. Espiculos delgados e longos tendo uma larga aza lateral na maior parte do comprimento; na extremidade basal tem um forte botão para insersão do musculo retractor e a extremidade distal é fina e curvada em forma de anzol; medem de comprimento cerca de 0,48 mm.; gubernaculo ausente.

Habitat: Intestino delgado de *Mesomys guiara* (BRANTS).

Proveniencia: Angra dos Reis, Estado do Rio.

O roedor foi estudado e determinado pelo nosso prezado amigo Prof. MIRANDA RIBEIRO.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS.

Fig. 1. Extremidade anterior de face.
« 2. Capsula buccal de face.
« 3. Extremidade caudal.
« 4. Bolsa copuladora.
» 5. Espiculos.

MONODONTUS RARUS n. sp., nouveau nématode parasite du "MESOMYS GUIARA"

Par LAURO TRAVASSOS.

Nous allons décrire un nouveau parasite de l'un des rongeurs les plus rares du Brésil. Nous n'en avons examiné qu'un exemplaire mâle, et avons dû en retarder la description pendant bien des années, dans l'espoir de réussir à nous procurer un autre exemplaire de ce mammifère, ce qui ne nous a pas été possible. Il n'y a pas lieu de s'en étonner, car il s'agit d'une espèce très rare, dont on connaît tout au plus trois ou quatre specimens.

Nématode de petite taille ayant la bouche tournée du côté du dos, et une large capsule buccale. Il mesure en longueur 4,1 mm. et en largeur 0,38 mm. La cuticule est striée transversalement; anneau nerveux à environ 0,28 mm. de l'extrêmité antérieure. Bouche conduisant à une capsule buccale de 0,088 par 0,080 mm. Cette capsule présente, du côté du ventre deux lamelles semblables à celles qui s'observent chez le *Necator* et, dorsalement, dans le fond, une dent conique dans la ligne médiane; l'entrée de l'oesophage, au fond de la capsule buccale, est garnie de quatre protubérances chitineuses, aigües et peu visibles. L'eosophage est claviforme, et mesure environ 0,26 mm. de longueur sur 0,16 mm. largeur maxima. La poche copulatrice est large, et fonctionne comme pince dorso-ventrale, formée par le lobe dorsal et par l'un des lobes latéraux. (droit). Ses rayons boursaux répondent à la formule suivante: les ventraux avec tronc commun; le latéral antérieur isolé; les latéraux moyen et postérieur avec tronc commun (les rayons du lobe droit sont beaucoup plus forts que ceux du côté gauche et sont implantés un peu plus en arrière); rayons dorsaux avec tronc commun; rayons dorsaux externes naissant à des hauteurs différentes du dorsal, celui de droite plus grand que celui de gauche; le dorsal se bifurque en branches aux pointes bifidées, celle de droite plus forte; la longueur totale du rayon dorsal est de 0,26 mm. Spicules minces et longs avec une aile latérale large sur la plus grand; partie de la longueure à l'extrêmité basale se trouve un gros bouton pour l'insertion du muscle rétracteur. L'extrêmité distale est fine et recourbée en forme d'hameçon; ces spicules mesurent environ 0,48 mm. de long; gubernaculum manquant.

Habitat: Intestin grêle du *Mesomys guiara* (BRANTS).

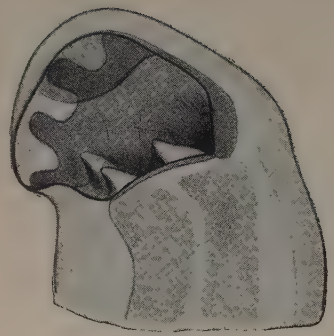
Provenance. Angra dos Reis, Etat de Rio.

Le rongeur a été étudié et déterminé par notre distingué collègue et ami, le Prof. MIRANDA RIBEIRO.

EXPLICATION DES FIGURES:

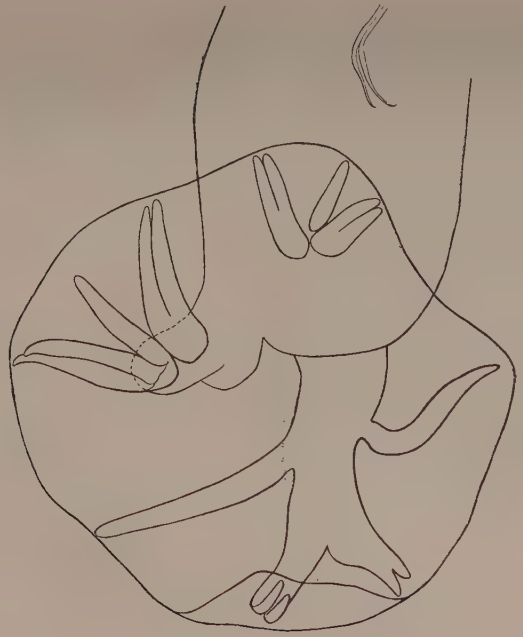
Fig. 1. Extrêmité antérieure, vue de face.
« 2. Capsule buccale, vue de face.
« 3. Extrêmité caudale.
« 4. Poche copulatrice.
« 5. Spicules.

1

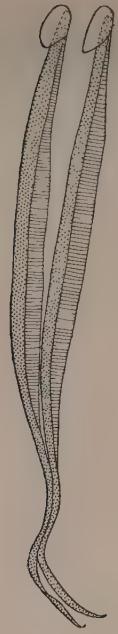


2

3



4



5

Molestia de HODGKIN e Corynebacterias

(Nota preliminar)

Pelo Dr. J. G. LACORTE.

O isolamento de bacillos pseudodiphthericos de ganglios de individuos atacados de molestia de HODGKIN data de 1913, quando NEGRI e MIEREMET (1) os descreveram, denominando-os *Corynebacterium granulomatis maligni*. Anteriormente FRAENKEL e MUCH (2) pesquisando o bacillo de KOCH em ganglios nas mesmas condições, conseguiram observar um bacillo gram positivo, não acido-resistente; opinaram por uma forma especial do bacillo de KOCH que no momento procuravam. Em trabalho tambem publicado em 1913, BUNTING e YATES (3) relatam suas primeiras pesquisas sobre o assumpto, tendo isolado o pseudodiphtherico em questão (por elles designado *Corynebacterium hodgkinii*) em 5 casos da referida molestia, sendo de tres delles em cultura pura. Num sexto caso verificaram pelo exame microscopico de esfregaços de ganglios, a presença de microorganismo semelhante, num caso intestinal da molestia. Os mesmos autores e outros isolaram diphtheroides em ganglios lymphaticos de doentes de sarcoma, chloroma, doença de BANTI (no baço) e em associação com a tuberculose. BILLINGS e ROSENOW (4) igualmente os isolaram chegando a tentar vaccinotherapia. Outros autores, principalmente americanos, descreveram a seguir, detalhadamente, diphtheroides isolados de ganglios doentes, porem com diagnostico nem sempre seguro da molestia.

Apresentando-se um caso clinico de molestia de HODGKIN num doente dos Drs. H. MELLO e C. BOMFIM, foi o diagnostico confirmado histopathologicamente pelo Dr. MAGARINOS TORRES, que teve a bondade de nos chamar a attenção para o assumpto, fornecendo-nos as primeiras indicações a respeito do mesmo.

A nosso pedido, os Drs. MELLO e BOMFIM retiraram, por biopsia, com os necessarios cuidados de asepsia, um dos ganglios axillares do referido doente. Depois de reduzido a pequenos fragmentos, foram estes semeados em meios de LOEFFLER e PETROFF. Após 10 dias de estufa a 37°C., observámos, num dos tubos de PETROFF, uma grande colonia ou confluencia de colonias de aspecto humido e com certa tonalidade rosea. Ao exame microscopico verificámos desde logo tratar-se de um diphtheroide, e as provas seguintes concordaram com o descripto por BUNTING e YATES.

São bastonetes arredondados e curtos, principalmente nas culturas antigas, em que chega a tomar o aspecto de coccos. Nas culturas mais recentes, a sua morphologia é muito variavel: formas alongadas, agrupamentos baccillares, granulações metachromaticas de varios tamanhos, e depois, formas esphericas e de involução.

As culturas iniciaes são abundantes nos meios albuminosos, e as seguintes nos meios communs. Em anaerobiose é fraco o desenvolvimento.

O diphtheroide isolado não foi pathogenico para cobayas, coelhos, ratos e camondongos brancos e saguis. BUNTING e YATES estudaram a acção pathogenica em certos macacos, que não possuimos no momento. Os trabalhos neste sentido não têm sido tentados, ao que nos conste, entre nós, de modo que nos pareceu de certo interesse registrar o presente caso. Por ora é questão grandemente discutida o papel etiologico dos pseudodiphthericos na molestia de HODGKIN.

HODGKIN's disease and Corynebacteriae

(Preliminary note)

By Dr. J. G. LACORTE.

The isolation of pseudodiphtheric bacilli of ganglia of patients suffering from HODGKIN's disease, was made for the first time in 1913, when NEGRI and MIEREMET (1) described them, under the denomination of *Corynebacterium granulomatis maligni*. Former researches carried out by FRAENKEL and MUCH (2) to find KOCH's bacilli in ganglia under the same conditions, resulted in the observation of a gram positive, not acid-fast bacillus; they thought of a special form of the KOCH's bacillus they were looking for at that time. BUNTING and YATES (3) in 1913 report their first researches about the matter; they isolated this pseudodiphtheric bacillus (they named it *Corynebacterium hodgkinii*) in 5 cases of the above disease, three of them in pure culture; they verified the presence of a similar microörganism in a sixth case of an intestinal form of the disease; that was made by means of microscopical examination of ganglia's smears. Those two investigators and others, isolated the diphtheroids in lymphatic ganglia of patients suffering from sarcoma, chloroma, BANTI's disease (in the spleen) and also in association with tuberculosis. They were isolated too by BILLINGS and ROSENOW (4) who even tried the vaccinotherapy. Other investigators, mostly Americans, followed, to describe in detail the isolated diphtheroids of diseased ganglia but not always with a sure diagnosis of the disease.

A clinical case of HODGKIN's disease in one of Dr. H. MELLO's and Dr. C. BOMFIM's patient was available; the diagnosis was histopathologically confirmed by Dr. MAGARINOS TORRES who called our attention to the matter, providing us with the first indications about it.

At our request Dr. H. MELLO and Dr. C. BOMFIM removed by biopsy and with thorough aseptic care, one of the axillary ganglia of that same patient. The ganglion was reduced to small fragments which were smeared in LOEFFLER and PETROFF's media. After ten days incubating at 37°C., we observed in one of the PETROFF's tubes a large colony or confluence of colonies with wet appearance and rose shade. At microscopical examination, we verified immediately we were dealing with a diphtheroid; later proofing agreed with the description of BUNTING and YATES.

These diphtheroids are round and short rods, specially in old cultures, in which they may take the aspect of cocci. In younger cultures, their morphology is most variable: lengthened forms, bacillar groups, me-

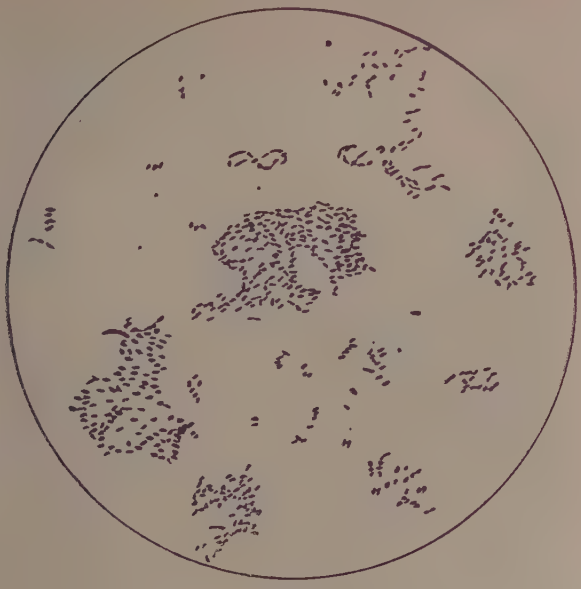


Fig. 1

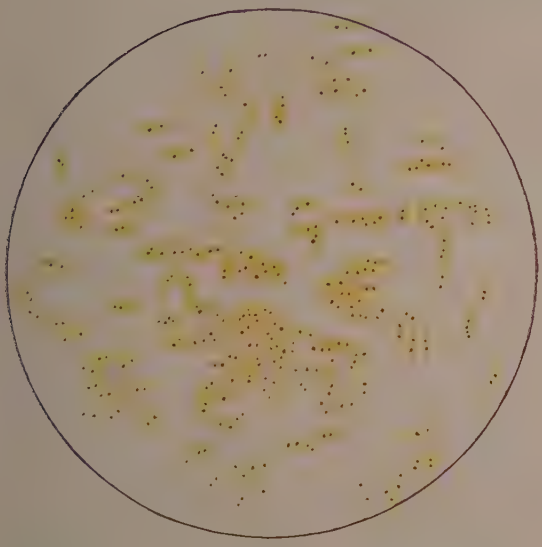


Fig. 2

A. Leal, del.

Fig. 1 -Esfregaço de cultura de 8 dias. Coloração : Methodo de GRAM. Augmento : 1000 d.
Fig. 1—A film of an 8 days' culture. Staining : GRAM's method. Magnified : 1000 d.
Fig. 2—Esfregaço de cultura de 30 horas. Colaração : II. Methodo de NEISSER. Augmento: 1000 d.
Fig. 2—A film of a 30 hours' culture. Staining : II. NEISSER's method. Magnified : 1000 d.

Typ. do Inst. Osw. Cruz

tachromatic granulations of various sizes, afterwards spherical and involution forms.

The initial cultures ares abundant in albuminous media, and the following ones in common media. In anaerobiotic condition, their delopment is weak. The isolated diphtheroid showed no pathogenic action either to Guinea pigs, rabbits, white rats and mice, and marmosets. BUNTING and YATES studied its pathogenic action in certain monkeys which at present are not available to us. Works in that line seem to us not as having been undertaken in Brazil, so we thought worth to mention the case above. Presently the etiological part played by the pseudodiphtceric bacilli in HODGKIN's disease, remains a greatly discussed question.

BIBLIOGRAPHY.

(1) NEGRI, E. e MIEREMET, C. W. G. – Zur Aetiologie des malignen Granuloms. Cent. f. Bak. Bd. 68 p. 293—1913.

(2) FRAENKEL, E. e MUCH, H. – Ueber die Hodgkinsche Krankheit (Lymphomatosis granulomatosa) insbesondere deren Aetiologie.—Zeit. f. Hyg. u. Inf. Krankh. B. 67, p. 159 1910.

(3) BUNTING, C. H. and YATES, J. L.—Cultural results in Hodgkin's disease – Arch. Int. Med. v. 12 p. 236, 1913.

(4) BILLINGS, F. and ROSENOW. E. C. – The etiology and vaccine treatment of Hodgkin's disease. – Journ. of. Amer. Med. Ass. v. 61 p. 2122 – 1913.

Notas sobre CYCLOCOELIDAE

Pelo Dr. LAURO TRAVASSOS.

Em uma bella publicação sob o titulo acima, na qual WITENBERG, descreve duas novas especies de trematodeos desta familia e faz algumas considerações sobre trabalhos do mesmo assumpto não examinado em sua notavel monographia dos *Cyclocoelidae*.

Uma destas publicações é nossa, e sobre ella faz as seguintes notas:

1) *Ophthalmophagus magalhãesi*. Examinando as duas figuras nossas, admitte tratar-se de duas especies. Não tem razão o brilhante helminthologista, pois uma das figuras representa forma nova, ainda immatura. Observei todas as fórmas intermediarias, pois as differenças notadas não nos passaram despercebidas. Provavelmente devido a publicação ter sido feita em portuguez, não foi bem comprehendida por WITENBERG.

2) *Typhlocoelum neivai*. Julga *T. neivai* dever constituir um novo genero. Estamos inteiramente de accordo com WITENBERG e tinhamos a intenção de fazer o novo genero, que denominamos *Neivaia* n. g., com a seguinte diagnose: *Cyclocelidae*. Intestino sem ceccos; testiculos de fórma alongada sem ramificações; ovario redondo; vitellinos extra-ceccaes, desde a zona do pharynge até abaixo da zona ceccal: alças uterinas intra-ceccaes. Especie typo *N. neivai* (TRAV. 1925).

3) *Typhlocoelum obovale* NEUMANN. Julga *T. obovale* igual a *T. cucumerinum*. Com esta opinião tambem estamos de accôrdo, apenas não tendo examinado o material europeu, não nos julgámos autorizado a fazer a identificação, realizada com toda a autoridade, por WITENBERG.

Rio, 27 – II – 1929.

Exame do sangue na anemia Helminthica

Por GILBERTO G. VILLELA (do Instituto Oswaldo Cruz)

E

J. CASTRO TEIXEIRA (do Hospital Oswaldo Cruz)

Os methodos empregados por SCHMIDT, BUNGE e ABDERHALDEN no estudo da constituição do sangue normal, emprehendidos ha muitos annos, requerem technica pouco pratica e quantidades grandes de sangue, de difficil obtenção quando são necessarias dosagens repetidas, como só é acontecer nos casos pathologicos. Foi só após a introducção dos micromethodos nas analyses dos humores do organismo, que os estudos biochimicos puderam tomar incremento, abrindo novos horizontes á pathologia.

No que diz respeito ás anemias, ainda são escassos os trabalhos relativos á composição chimica do sangue. Ainda menos numerosos são aquelles que visam sómente as anemias produzidas pela infestação de nemathelminthos (ancylostomideos).

Nesta entidade nosologica tornam-se especialmente interessantes as verificações sobre a composição chimica do sangue e suas variações, devido ás complicações a ella associadas no dominio renal e hepatico.

No presente trabalho procurámos estudar alguns elementos inorganicos, taes como o calcio, o potassio e o chloro, e ainda a cholesterina e as albuminas totaes. Em alguns casos determinámos a reserva alcalina cujo interesse se acha ligado ao funccionamento geral do organismo. Os exames hematologicos, que acompanham as observações, mostram o gráo de anemia e os melhoramentos obtidos pelo tratamento.

Os methodos por nós empregados visaram aliar a execução facil do processo á precisão sufficiente de que necessitam as conclusões clinicas.

O sôro, em todos os casos, foi separado do coagulo lógo após a retração deste, sendo então centrifugado e dahi utilizado para as dosagens. Deste modo, as determinações dos chloretos e do potassio não ficaram prejudicadas, o que não aconteceria si o sôro ficasse muitas horas em contacto com os globulos, como observou FRIDERICIA.

Na dosagem do calcio, seguimos a technica de CLARK e COLLIP, e na do potassio a de KRAMER e TISDALL, ambas de emprego hoje generelizado. Na dosagem do potassio, é conveniente deixar o sôro em contacto com o reactivo nitrico-cobaltico durante 50 minutos afim de, si existir excesso de potassio, precipital-o por completo.

Os valores medios normaes para o calcio já foram objecto de estudo de um de nós, feito anteriormente (1) e correspondem a 10,5 mgrs. em 100 c. c. de sôro, sendo que os limites extremos são de 8,9 a 12 mgrs. Quanto ao potassio, os numeros medios são de 16,5 a 22 mgrs. em 100 c. c., como se pode verificar no quadro n. 1.

(1) VILLELA (G. G.) Calcemia normal no Rio de Janeiro. Sciencia Medica Março 1928.

A cholesterina foi dosada pela technica de BLOOR, modificada por SACKETT e adaptada por CARNEIRO FELIPPE ao emprego do padrão do colorimetro de HELLIGE. E' de facil execução e de precisão satisfactoria para os fins clinicos. Baseia-se na extracção pela mistura alcool-ether (3 : 1) directamente do sôro (0,1 c. c. para 6 c. c. da mistura), durante 30 a 40 minutos, centrifugando e evaporando em banho-maria o liquido que sobrenada. Extrae-se o residuo pelo chloroformio, de modo a obter 5 c. c. e neste se pratica a reacção de LIEBERMANN (2 c. c. de acido acetico anhydrido e 0,1 c. c. de acido sulfurico concentrado) e a coloração verde obtida é comparada com a do prisma padrão no colorimetro de HELLIGE. Por meio deste processo os valores da cholesterina são pouco superiores aos dos outros methodos (BLOOR). A media por nós encontrada se acha entre os numeros 170 a 220 mgrs. em 100 c. c.

Quanto á dosagem do chloreto de sodio, empregamos a technica de WHITHORN e FOLIN. O sôro (1 c. c.) é defecado pela mistura de tungstato de sodio a 10 % e acido sulfurico 2/3 N (1 c. c. de cada) em balão onde se completa o volume para 10 c. c. Filtra-se e retiram-se 5 c. c. do filtrado, onde se addicionam 10 c. c. de nitrato de prata N/100 e gottas de acido nitrico concentrado e mais o indicador (Alumen ferrico-ammoniacal). Titula-se então pelo rhodanato de ammonio N/10 com microbureta. Normalmente existem no sôro de 510 a 600 mgrs. de chloreto de sodio em 100 c. c.

As albuminas totaes foram determinadas pelo indice refractometrico (apparelho de ABBE-ZEISS). Este methodo dá bons resultados e é de precisão sufficiente para os fins clinicos, conforme foi demonstrado por numerosos pesquizadores (REISS, ROBERTSON, ROWE, NEUHAUSEN e RIOCH). Empregámos a tabella de REISS para as percentagens de albumina relativas ao indice refractometrico, sendo que a temperatura foi corrigida de accordo com o processo de STRAUSS e CHAGÈS, o qual consiste em addicionar 0,0001 ao indice lido, para cada gráo superior a 17,5°C. Tivemos o cuidado de verificar experimentalmente a exactitude desta correcção.

A reserva alcalina só foi feita em alguns casos, não se afastando dos limites normaes. Empregámos o apparelho de VAN SLYKE, de fabricação allemã, como tambem a technica preconizada pelo autor. Seria de maior interesse si, conjunctamente com a reserva alcalina, pudessemos ter determinado o pH e a tensão do CO^2 alveolar, afim de ter uma ideia mais nitida do equilibrio acido-basico e de sua regulação. Em todo o caso, as variações offerecidas pelos plasmas estudados, não mostraram haver atastamentos pronunciados da media normal, assim como tambem os dados clinicos não faziam suppôr nenhum desvio do equilibrio acido-basico.

A primeira vista, os dados para a reserva alcalina podem parecer baixos, mas como se trata de doentes de pouca idade (11 a 16 annos), os numeros se emquadram perfeitamente nas medias consideradas normaes para creanças (46 a 63 c. c. de CO^2 em 100 c. c. de plasma, SCHLOSS e STETSON).

Abaixo reproduzimos os diversos numeros, considerados pelos autores americanos e europeus, como representando as quantidades normaes dos elementos acima referidos.

Em 100 c. c. de sôro:

Calcio — de 9 a 12 mgrs. (MYERS, CLARK e COLLIP, KRAMER).
Potassio — de 16 a 20 mgrs. (KRAMER e TISDALL, DENIS e HOBSON, HAWK e BERGEIM).
Chloretos — de 570 a 620 mgrs. (DENIS e HOBSON, EUGSTER, BIERNACKI).
Cholesterina — de 170 a 200 mgrs. (MYERS, UNDERHILL, BLOOR).
Albuminas totaes — de 7 a 9 grs. (REISS, HAWK e BERGEIM).
Reserva alcalina — de 55 a 75 c. c. de CO^2 (a 0º e 760 mm.) para 100 c. c. de plasma (VAN SLYKE e CULLEN, MYERS).

Afim de melhor apreciar as variações pathologicas, tivemos a opportunidade de dosar, em alguns sôros normaes os elementos em questão. Os resultados por nós obtidos concordam com os referidoss pelos autores extrangeiros, como se pode apreciar na tabella abaixo.

QUADRO N. 1

Em mgrs. para 100 c. c. de sôro.

Nº.	Potassio	Chloretos	Cholesterina	Albuminas totaes	Reserva alcalina
1	18.2	585	260	7400	63
2	20.3	620	280	8900	53.2
3	19.4	587	178	9000	70.1
4	22.1	510	190	9100	65.4
5	20.0	580	210	8600	58.4
6	19.3	520	220	8900	57
7	18.3	530	250	7800	62.8
8	16.5	520	210	8400	73.3
9	17.8	587	184	8600	77.1
10	19.8	610	199	8700	62.4

Uma das questões mais estudadas em pathologia é a da pathogenia dos edemas. Os nossos resultados não permittem tirar conclusão alguma definitiva sobre a relação existente entre os electrolytos do sôro e a formação dos edemas. Muitos outros pesquizadores teem procurado evidenciar este ponto obscuro, mas as opiniões ainda divergem muito, não permittindo por emquanto, conclusão positiva a respeito.

Entretanto, parece que o calcio tende a baixar, o potassio a permanecer ou diminuir o seu teôr, ao contrario dos chloretos que quasi sempre augmentam. A baixa do calcio, que se observa em alguns casos, talvez corra por conta da diminuição das albuminas totaes, como o demonstraram SALVESEN e LINDER, CIPRIANI e MOLFESE, BOKAY e outros para o sôro de nephriticos. Comtudo, pode haver hypoalbumose sem alteração do calcio, como se nota no caso IX.

O potassio apresentou em geral numeros baixos, facto este que parece se relacionar, de um lado com o gráo de anemia, e de outro com as

perturbações renaes. KRAMER e TISDALL, MYERS e SHORT, KAULFTHEIL e KISH verificaram variar o potassio em relação directa com a percentagem de hematias, de modo que, ao que parece, nas anemias a diminuição deste metal deve se relacionar unicamente com a baixa globular. O caso XI, apezar de muito anemiado, (980.000 hematias por mmcc.) não apresentou baixa sensivel do potassio, mas sim do calcio, e provavelmente este desequilibrio se acha ligado com a producção de edemas pronunciados de que era portador o enfermo. Neste caso a relação K/Ca é elevada (2.2), pois normalmente é de 1.9, evidenciando desequilibrio na isoionia do sangue. Muitos autores acreditam ser esta relação de maior importancia para o conhecimento do estado renal, do que as variações de um unico elemento isolado. Nos casos por nós estudados, esta relação se mostrou variavel em 5 dentre elles (I, II, IV, X e XIII).

Os chloretos se apresentaram augmentados nos doentes I, III, V, VI, VIII, X e XIV. A cholesterina se mostrou mais elevada no começo da doença, abaixando com o tratamento. As albuminas totaes, em quatro casos, deram numeros bem abaixo da media normal, estando pois de accordo com os dados encontrados em outros typos de anemia (ROWE).

Com o tratamento antihelminthico e o restabelecimento das proporções entre o coagulo e o sôro, observa-se o augmento das albuminas, como tambem do calcio e do potassio. A cholesterina soffre sómente pequenas variações.

As observações clinicas foram feitas no Hospital Oswaldo Cruz, graças á gentileza do Prof. EURICO VILLELA, director do Hospital, a quem depositamos os nossos sinceros agradecimentos. Ao Prof. CARNEIRO FELIPPE que nos encaminhou nas technicas que serviram para a execução deste trabalho, bem como aos ensinamentos a nós prestados, nos consideramos muito agradecidos.

OBSERVAÇÕES CLINICAS.

I.—J. R. A. Reg. 34 Idade: 13 annos. Côr: branco. Sexo: masculino. As dosagens foram feitas logo após os 2 primeiros vermifugos. Face descorada e mucosas idem. Edema leve. Area cardiaca augmentada. Tensão mx 10 e mm. 4 1/2. Ovos de parasitos nas fezes. WASSERMANN negativo. Hemoglobina: 15 %. Hematias: 1.705.000 mm³. Apos o tratamento: 66 % hemoglobina. Hemaias 3.632.000 mm³.

II.—O. S. Reg. A. 91. Sexo: Masc. Idade: 11 annos. Brasileiro. Internou-se com dyspnéa facil, cançaço, palpitações, tonteiras. Palidez cerea accentuada, mucosas descoradas, edemas dos membros inferiores e da face. Area cardiaca augmentada, sopro mesosystolico. Tensão minima baixa. R. WASSERMANN positiva. Hematologia—45 % de hemoglobina. 2.900.000 glob. vermelhos. Exame de fezes—numerosos ovos de ancylostomos. Raros de Trichocephalos. Após tratamento pelo chenopodio, houve melhoria do estado geral. Ausencia de ovos de ancylostomos nas fezes. Albumina negativa na urina. Hematias—3.280.000. Hemoglobina 75 %.

III.—S. P. S. Reg. A. 71. Sexo: feminino. Idade: 17 annos. Parda. Canceira, cephalalgia, palpitações. Já teve edema dos membros inferiores. Pelle palida e mucosas descoradas. Sopro mesosystolico e augmento da area cardiaca. Tensão mx. 11 1/2 mm. 5 1/2 (methodo auscultatorio). Hematias—

2.940.000. Hemoglobina 28 o/o. Presença de ovos de ancylostomideos nas fezes. R. WASSERMANN positivo. Albumina, traços. Tratamento pelo chenopodio—Melhoras geraes. 57 o/o de hemoglobina. Hematias—4.120.000 mm³. Albumina negativa.

IV.—J. I. C. Reg. A. 99. Idade: 32 annos. Sexo: Masculino. Pardo. Já teve malaria. Canceira, desanimo para o trabalho. Edema dos membros inferiores. Falta de appetite. Mucosas descoradas e palpebras edemaciadas. Pelle amarella terrosa. Sopro mesosystolico. Dilatação cardiaca. Tensão 11 e 5 1/2 mm. Albumina: traços. Hemoglobina 16 o/o. Hematias: 1.286.000. Ovos de ancylostomos nas fezes. Tratamento pelo chenopodio—Hemogl. 74 o/o Hematias 3.920.000 mm³. Estado geral bom.

V.—J. T. A. Reg. 179. Idade: 14 annos. Sexo: Masculino. Fraqueza, edema e palidez. Sopro mesosystolico, area cardiaca augmentada. Tensão mx 12 e mm. 5 1/2. Hemoglobina 29 o/o. Hematias 1.760.000. Presença de ovos de ancylostomos nas fezes. R. WASSERMANN: positivo. Tmx: 11 e Tmn: 6. Hemoglobina—70 o/o. Hematias: 3.832.000 mm³.

VI.—C. J. M. Reg. A. 56. Idade: 41 annos. Sexo: Masculino. Canceira, palidez, mucosas descoradas. Teve malaria. Leve edema das palpebras e face. Area cardiaca augmentada. Sopro mesosystolico. Tensão mx 12 e mn. 7. Hemoglobina 19 o/o. Hematias 2.460.000 mm³.

VII.—J. P. A. Reg. 194. Idade: 15 annos. Sexo: feminino. Palidez cerea, mucosas descoradas. Grande edema dos membros inferiores, discreto das faces. R. WASSERMANN negativo. Area cardiaca augmentada. Sopro mesosystolico. Hemoglobina: 21 o/o. Hematias: 2.100.000 mm³. Tratamento com chenopodio. Estado geral bom.—Hemoglobina 75 o/o.—Hemátias: 4.250.000 mm³.

VIII.—B. R. Reg. A. 20[illegible]. Idade: 47 annos. Sexo: Masculino. Branco Portuguez. Agravou-se o seu estado ha 6 mezes. Cançaço, dyspneico quando trabalha. Desanimo para o trabalho. Já tomou vermifugos. Edema dos membros inferiores. Mucosas descoradas: Lingua pallida. Tensão mx. 13 e mn. 7. Sopro mesosystolico, area cardiaca augmentada. Ovos de ancylostomos nas fezes. R. WASSERMANN: negativo. Hemoglobina 25 o/o. Hematias 1.600.000 mm³.

IX.—L. R. Reg. A. 203. Idade: 11 annos. Branca. Brazileira. Cançaço, desanimo para o trabalho, côr pallida. Pouco desenvolvida para a idade. Mucosas descoradas. Leve edema na face e labios inferiores. Tmx. 11 e Tmn. 6. Area cardiaca augmentada. Sopro mesosystolico. Albumina na urina: traços. Hemoglobina: 32 o/o. Hematias: 2.320.000 mm³. Após o tratamento—Hemoglobina: 60 o/o. Hematias: 3.420.000 mm³.

X.—M. R. Reg. A. 206. Branco. Sexo: Masculino. Idade: 16 annos. Internado em estado grave. Anemia intensa. Pelle cerea e labios descorados. Dilatação cardiaca, sopro mesosystolico. Syndroma dysenteriforme. Nivel mental baixo. Doente desde creança. Hemoglobina: 9 o/o. Hematias 980.000 mm³. Ovos de ancylostomideos nas fezes. R. WASSERMANN: negativo.

XI.—M. R. Reg. A. 266. Sexo: Masculino. Idade: 15 annos. Branco. Desanimo. Face descorada. Leve edema dos membros inferiores. Mucosas descoradas. Tensão mx 11 e mm. 6. R. WASSERMANN: negativo. Hemo-

globina 34 o/o. Hematias 1.920.000 mm³. Tratamento pelo chenopodio.— Hemoglobina: 62 o/o.

XII.—F. A. Reg. 3157. Idade: 12 annos. Branco. Canceira. Desanimo. Face e mucosas descoradas, geophagia. Tensão mx 11 e mn 4 1/2. Area cardiaca augmentada. Sopro mesosystolico. Hemoglobina 40 o/o. Hematias 3.100.000 mm³. Ovos de parasitos nas fezes e traços de albumina.

XIII.—A. M. S. Reg. A. 249. Idade: 15 annos. Sexo: Masculino. Pardo. Brasileiro. Estado adiantado de fraqueza, não podendo trabalhar. cançando-se facilmente. Foi sempre doente, côr pallida. Mucosas descoradas. Labios idem. Teve edema dos membros inferiores. Sopro mesosystolico. Augmento da area cardiaca. Tensão mx. 11 e mn. 6. Ovos de ancylostomos, raros de Trichocephalos. Traços de albumina na urina. Hemoglobina: 18 o/o Hematias: 2.200.000 mm³.

XIV.—S. E. S. Brasileiro. Branco. Idade: 24 annos. Sexo: Masculino. Pallidez accentuadissima, cerea. Mucosas muito descoradas. Edema da face, grande edema dos membros inferiores. Pequena ascite. Dyspnéa. Tensão mx. 11. Tensam mn. 5. Grande augmento da area cardiaca. Figado augmentado. Hemoglobina 15 o/o. Hematias: 1.160.000 mm³.

CONCLUSÕES:

I. O calcio variou pouco nos casos observados.

II. O potassio na maioria dos casos se apresentou com numeros baixos. A relação K/Ca variou de 1,7 a 2,3 sendo de 1,9 a normal.

III. Nos doentes graves, o chloreto de sodio se mostrou elevado (casos: I, III, V, VI, VIII, X e XIV). A cholesterina se encontrou sempre elevada.

IV. As albuminas totaes baixam, de accordo com a gravidade dos casos.

V. Os elementos acima referidos voltam ás percentagens normaes após o tratamento antihelminthico.

BIBLIOGRAPHIA

1. KRAMER e TISDALL—Journ. of Biol. Chem. Vol. 46 1921 p. 339.
2. SACKETT—Id. Vol. 64 1925 p. 205.
3. NORGAARD e GRAM—Id. Vol. 46 1921 p. 263.
4. MYERS e SHORT—Id. Vol. 48 1921 p. 83.
5. KAUFTHEIL e KISH—Klin. Wochensch. Vol. 6 1927 p. 1328.
6. DENIS e HOBSON—J. Biol. Chem. Vol. 55 1923 p. 183.
7. EUGSTER—Z, f. Klin. Med. Vol. 107 1928 p. 224.
8. MYERS—Practical Chemical Analysis of Blood. 1924.
9. ROBERTSON—J. of Biol. Chem. Vol. 22 1918 p. 233.
10. VAN SLYKE—Id. Vol. 68 1921 p. 153.
11. VILLELA (G. G.) Sciencia Medica 1928 Março.

QUADRO N. 2

CASO	NOME	Calcio em mgrs. por 100 c.c.	Potassio em mgrs. por 100 c.c.	Relação K/ca	Chloretos em mgrs. por 100 c.c.	Cholesterina em mgrs. por 100 c.c.	Albuminas totaes em grs. por 1.000 c.c.	Reserva alcalina em c.c. de CO^2 a 0º 760 mm.	Hemoglobina (Gowers-Sahli)	Hematias por mm^3
I	J. R.	10.8	19.3	1.7	643	260	75	——	66 o/o	3.632.000
II	O. (a)	8.0	16.3	2.3	480	130	61	——	45 o/o	2.900.000
	O. (d)	10.1	18.1	1.8	450	174	87	——	75 o/o	3.280 000
III	S. P. (a)	8.6	18.0	2.1	620	135	82	——	28 o/o	2.940.000
	S. P. (d)	9.9	——	——	538	—	89	——	57 o/o	4.120.000
IV	J. J. C. (a)	10.0	17.4	1.7	538	220	80	——	16 o/o	1.286.000
	J. J. C. (d)	10.0	18.1	1.8	520	164	93	——	74 o/o	3.920.000
V	J. T. (a)	10.1	19.8	1.9	586	250	75	——	29 o/o	1.760.000
	J. T. (d)	10.2	20.1	1.9	580	176	89	——	70 o/o	3.832.000
VI	C. J. M.	10.1	22.3	2.1	620	244	75	——	19 o/o	2.460.000
VII	J. P. (a)	9.0	17.2	1.9	420	240	65	68.3	21 o/o	2.100.000
	J. P. (d)	10.2	18.4	1.8	520	220	82	57.9	—	——
	J. P. (d)	10.4	18.3	1.7	510	200	86	58.3	75 o/o	4.250.000
VIII	B. R.	9.4	18.1	1.9	640	200	70	59.3	15 o/o	1.430.000
IX	L. (a)	10.0	19.3	1.9	604	226	55	65.1	32 o/o	2.320.000
	L. (d)	10.3	18.6	1.8	580	220	80	50.4	68 o/o	3.420.000
X	M. R. (a)	9.7	16.7	1.7	610	198	81	56.3	34 o/o	1.920.000
	M. R. (d)	9.9	18.4	1.8	549	160	83	54.1	62 o/o	———
XI	M. (x)	7.9	17.8	2.2	549	178	59	46.1	9 o/o	980.000
XII	F.	9.5	18.0	1.9	596	200	84	62.0	40 o/o	3.100.000
XIII	A.	10.1	17.7	1.7	580	220	76	61.6	18 o/o	2.200.000
XIV	J. E. S.	8.9	19.3	2.1	653	180	60	70.2	15 o/o	1.160.000

Blood study in hook-worm anemia

By GILBERTO G. VILLELA (From Oswaldo Cruz Institute)

AND

J. CASTRO TEIXEIRA (From Oswaldo Cruz Hospital)

The methods used many years ago by SCHMIDT, BUNGE and ABDERHALDEN for studying the constitution of normal blood, require uneasy technics and large quantities of blood, not practically obtainable when needed for repeated dosages, as generally happens in pathological cases. Biochemical studies were possible to be developed only after introducing the micro-methods in analysis of fluids of the organism, thus opening new and wider fields to pathology.

With regard to "anemia", few have been the works referring to the chemical composition of blood. Still scarcer are those which treat of anemia consecutive to infection by nemathelminths (ancylostomidae).

Under this nosological point of view, verifying the chemical composition of blood and its variation, appears as of specially great interest, in view of the complications occurring together with same in reference to kidney and liver changes.

The present work is intended to study a few inorganic elements, like calcium, potassium and chlorides, as also the cholesterol and the total proteins. In some cases, we determined the alkali reserve, the interest of which is connected with the general working of the organism. The hematological examinations which accompany our observations show the extent of the anemia and the improvements derived from the treatment.

The methods we used, were intended in view of an easy execution allied to the sufficient accuracy required in clinical conclusions.

The serum, was, in every case, separated from the coagulum, immediately after retraction of the latter, being then centrifugated and used afterwards for dosages. This way of doing enabled us to easily determine chlorides and potassium, which would not have been the case, had the serum remained for hours in contact with the globules, as observed by FRIDERICIA.

Calcium determination was effected according to CLARK and COLLIP's method, that of potassium by KRAMER and TISDALL's, both being nowadays of general use. In dosing potassium, it is advisable to leave the serum in contact with the nitric-cobaltic reactive during some 50 minutes, so as to fully precipitate the excess of potassium, if any.

The normal average values for calcium have been object of a previous study of one of us (1) and are equal to 10,5 mgrs, per 100 c.c. of serum, extreme limits ranging from 8,9 to 12 mgrs. Regarding potassium, the average figures are 16,5 to 22 mgrs. per 100 c. c., result shown in table n. 1.

(1) VILLELA G. G. Calcemia normal no Rio de Janeiro, Sciencia Medica March 1928.

Cholesterol was dosed by BLOOR's method, modified by SACKETT and adapted by CARNEIRO FELIPPE, to the use of the standard figures of HELLIGE's colorimeter. It is easily worked out and shows sufficient accuracy for clinical purposes. It is based on extracting directly the serum by the mixture alcohol-ether (3 : 1) (0,1 c. c. of serum of the mixture), during 30 to 40 minutes, centrifugating and evaporating afterwards on water-bath, the overfloating liquid. The residue is then extracted by chloroform, making it up to 5 c. c. in which the LIEBERMANN's reaction is then effected (2 c. c. of anhydride acetic acide and 0,1 c. c. of concentrated sulphuric acid) the green colour thus obtained being henceforth compared with that of the prism of standards in HELLIGE's colorimeter. By this method, the values for cholesterol are a trifle higher than those of other systems (BLOOR). The average we found range between the figures 170 to 200 mgrs. per 100 c.c.

With regard to dosage of the sodium chloride, we applied to WHITHORN and FOLIN's technics. The serum is defecated by the mixture of sodium tungstate 10 %, and sulphuric acid 2/3N (1 c. c. of each) in a flask in which it is made up to 10 c. c. The whole is filtered. 5 c. c. of the clear solution are withdrawn and added 10 c. c. of silver nitrate N/100, drops of concentrated nitric acid, plus the indicator (ferric-ammoniacal alum). The titration is then effected by ammonium rhodanate N/10 with the microburette. A normal average for serum is 510 to 600 mgrs. sodium chloride per 100 c. c.

Total proteins have been determined by the refractometric index (apparatus of ABBE-ZEISS). This method ensures good results and is sufficiently accurate for clinical purposes, as has been demonstrated by many authors (REISS, ROBERTSON, ROWE, NEUHAUSEN and RIOCH). We made use of REISS's table for the percentages of albumin referring to the refractometric index, correction for temperature being effected in accordance with STRAUSS's and CHAGES's system, this consisting in adding 0.0001 to the index gathered for each grade above 17,5°C. We took care to submit the accuracy of this correction, to experimental test.

The alkali reserve was only effected in a few cases, the same never going beyond normal limits. We used the VAN SLYKE's apparatus of German make, as also the technics recommended by the author. It would have been of great interest if, together with the alkali reserve, we had been able to ascertain the pH and tension of alveolar CO^2, so as to have got a better idea about the acid-basic equilibrium and its regulation. Anyhow, the variations shown in the plasmas we studied, did not prove high differences beyond or within the normal average. Also clinical data did not give way to foresee any break of the acido-basic equilibrium.

At first sight, the data as to alkali reserve may appear to be low, but the case being of young patients, (11 to 16 years old) the numbers remain in perfect standing with the average considered as normal for children, (46 to 63 c. c. of CO^2 per 100 c. c. of plasma, SCHLOSS and STETSON).

We reproduce hereunder the various figures, considered by the American and European authors, as being the normal quantity of the elements above referred to.

In 100 c. c. of serum :

Calcium — 9 to 12 mgrs. (MYERS, CLARK and COLLIP, KRAMER).

Potassium — 16 to 20 mgrs. (KRAMER and TISDALL, DENIS ——— HOBSON, HAWK and BERGEIM).

Chlorides — 570 to 620 mgrs. (DENIS and HOBSON) EUGSTER, BERNACKI.

Cholesterol — 170 to 200 mgrs. (MYERS, UNDERHILL, BLOOR).

Total proteins — 7 to 9 grs. (REISS, HAWK and BERGEIM).

Alkali reserve — 55 to 75 c. c. of CO^2 (at 0°—760 mm.) per 100 c. c. of plasma (VAN SLYKE and CULLEN, MYERS).

In order to get a better appreciation of the pathological variations, we had an opportunity to dose the elements referred to in a few normal serums. The results we got at, are in accordance with the mentioned foreign authors, as shown in the following table:

TABLE N. 1

In mgrs. per 100 c. c. of serum.

No.	Potassium	Chlorides	Cholesterol	Total Proteins	Alkali Reserve
1	18,2	585	260	7400	63
2	20,3	620	280	8900	53,2
3	19,4	587	178	9000	70,1
4	22,1	510	190	9100	65,4
5	20,0	580	210	8600	58,4
6	19,3	520	220	8900	57
7	18,3	530	250	7800	62,8
8	16,5	520	210	8400	73,3
9	17,8	587	184	8600	77,1
10	19,8	610	199	8700	62,4

A question mostly studied in pathology is that referring to pathogeny of "edema". Our own results do not allow to draw any definite conclusion about the relationship that may exist between the electrolytes of serum and the formation of "edema". Many other searchers have tried to bring to light this still unexplained point, but opinions are too different to enable one deciding positivelly on the subject.

Meanwhile, it seems as if the calcium would show a tendency to lower, the potassium to remain at the same rate, or decrease slightly, whereas chlorides almost steadily increase. The fall of calcium, which is observed in some cases, might perhaps be ascribed to the decrease of total proteins, as demonstrated by SALVESEN and LINDER, CIPRIANI and MOLFESE, BOKAY and others for the serum of nephritic patients. Nevertheless, there may exist hypoalbumose without any change in calcium, as may be seen in case N. IX.

Potassium shows generally low figures, which fact seems to be de-

pendent upon, on one part the severeness of "anemia", and on the other part, the kidney troubles. KRAMER and TISDALL, MYERS and SHORT, KAULFTHEIL and KISH verified that the potassium rate varies according to the percentage of red blood corpuscles, so that, as far as would appear in "anemia", the decrease of this metal should depend exclusively on the globular decrease. In case XI, in spite of severe anemia (980.000 red corpuscles per mmcc.) no serious decrease of potassium was shown. On the other hand, calcium had diminished, which break of equilibrium should probably be accounted for by the appearance of serious "edema" on the patient. In this case, the proportion K/Ca is a high one (2,2), 1,9 being the normal, thus showing a break of equilibrium in the isoionia of the blood. Many authors believe this proportion to have a greater importance for the diagnose of the renal condition than the variations of one single element. Among the cases studied by us, this proportion was variable in 5 (I, II, IV, X and XIII).

Chlorides appeared increased in the patients I, III, VI, VIII, X and V. Cholesterol proved to be higher at the beginning of the illness, decreasing with the treatment. Total proteins proved, in four cases, to be lower than the normal average, thus being concordant with the data gathered in other forms of anemia (ROWE).

In the course of the antihelminthic treatment, being restored the proportion between the coagulum and the serum, an increase of proteins is obvious, the same occurring with calcium and potassium. Cholesterol undergoes only slight changes.

The clinical observations were effected at the Oswaldo Cruz Hospital, thanks to the kindness of Prof. EURICO VILLELA, the director of the said Hospital, to whom we feel most obliged. To Prof. CARNEIRO FELIPPE, who guided us through the technical process we used to bring this study to light, and to those of whose teaching we may avail ourselves, we also tender our best thanks.

SUMMARY OF CLINICAL RECORDS.

I. – J. R. A. Reg. 34. Age: 13 years. White. Masculine. Determinations were made immediately after the two first vermifuges. Face and mucosae pale. Slight edema. Cardiac area increased. Arterial tension: maxima 10 and minima 4 1/2. Hook-worms eggs in faesce. WASSERMANN negative. Red blood corpuscles 1.705.000 mm³. Hemoglobin 15 %. Improved: 66 % hemoglobine. – 3.632.000 red corpuscles.

II. – O. S. Reg. A. 91. Sex: Masc. age: 11 years. Brazilian. Interned with slight dyspnea, fatigue, palpitations, dizziness. Serious wax-like paleness, pale mucosae, edema in the inferior limbs and in face. Cardiac area increased. Mesostylic breath. Arterial minimum tension low. R. WASSERMANN positive. Hematologia—45 % hemoglobin; 2.900.000 mm³ red corpuscles. Examination of faesce—numerous eggs of ancylostomae, scarcely of Trichocephalus. After treatment by chenopodium, improvement of the general condition. Absence of eggs of ancylostomae in faesce. Negative albumin in urin. Red blood corpuscles—3.280.000 mm³. Hemoglobin 75 %.

III. S. P. S. Sex: feminine. Reg. A. 71. Age: 17 years. Metis. Fatigue, headache, palpitations. Had already edema in the inferior limbs. Skin pale

and mucosae discoloured. Mesostylic breath and increase of cardiac area. Max. tension 11 1/2 Min. 5 1/2 (auscultatory method). Red corpuscles – 2.940.000 mm³. – Hemoglobin 28 °/o. Presence of eggs of ancylostomidae in fesce. R. WASSERMANN positive. Albumin: traces. Treatment by chenopodium – General improvement. 57 °/o hemoglobin. Red corpuscles – 4.120.000 mm³. Albumin negative.

IV. – J. I. C. Reg. A. 99. Age: 32 years. Sex: masculine. Metis. – Had formerly malaria. Fatigue, despondency for work. Edema in inferior limbs. Lack of appetite. Discoloured mucosae and edemized eye-lids. Skin dull yellow. Mesostylic breath. Cardiac dilatation. Tension: 11 and 1/2. Albumin: traces. Hemoglobin 16 °/o. – Red blood corpuscles – 1.286.000 mm³. Eggs of ancylostomae in fesce. Treatment by chenopodium – Hemoglobin 74 °/o. Red blood corpuscles 3.920.000 mm³. – General state good.

V. – J. T. Reg. A. 179. 14 years old. Sex: Masculine. Weakness, edema and paleness. Mesostylic breath. Increase of the cardiac area. Tension: max. 11 and Mn 5 1/2. Hemoglobin 29 °/o. Red corpuscles 1.760.000 mm³. Presence of eggs of ancylostomae in fesce. R. WASSERMANN positive. Treatment. TMx: 11 and Tmn: 6. Hemoglobin 70 °/o.—Red corpuscles 3.832.000 per mm³.

VI.—C. J. M. Reg. A. 59. – Age: 41 years. Sex: masculine. Weariness. Paleness, discoloured mucosae. Had suffered from malaria. Slight edema of eye-lids and face. Increased cardiac area. Mesostylic breath. Tension: max. 12 and Mn 7. Hemoglobin 19 °/o. – Red corpuscles 2.460.000 mm³.

VII. – J. P. Reg. A. 194. – Age: 15. Sex: feminine. Wax-like paleness, discoloured mucosae. Big edema of inferior limbs. Slight in face. R. WASSERMANN negative. Increased cardiac area. Mesostylic breath. Hemoglobin 21 °/o. Red corpuscles 2.100.000 per mmc. Treatment with chenopodium: General state; good. Hemoglobin 74 °/o.—Red blood corpuscles 4.250.000 per mmc.

VIII. – B. R. Reg. A. 201.—Age: 47 years. Sex. Masculine. White. Portuguese. His state grew worse for the last 6 months. Weariness, dyspnea when at work. Strong dislike for work. Had already vermifuges. Edema in inferior limbs. Discoloured mucosae. Pale tongue. Tension: max. 13 and mn 7. Mesostylic breath. Expanded cardiac area. Eggs of ancylostomae in fesce. R. WASSERMANN negative. Hemoglobin 25 °/o.—Red blood corpuscles 1.600.0000 mm3.

IX.—L. R. Reg. A. 203. – Age: 11. White. Feminine. Brazilian. Weariness. Loathing for work. Paleness. Not developed in proportion to her age. Discoloured mucosae. Slight edema of face and inferior lip. Arterial tension: Max. 11 and Mn 6. Increased cardiac area. Mesostylic breath. Hemoglobin: 32 °/o. Red blood corpuscles 2.320.000 mm3. After treatment: Hemoglobin: 68 °/o. Red corpuscles 3.420.000 mm3. R. WASSERMANN: negative.

X. - M. R. Reg. A. 206.—White. Sex: Masculine. Age. 16 Interned in severe condition. Intense anemia. Wax-like skin and discoloured lips. Cardiac dilatation. Mesostylic stroke. Dysenteriform syndroma. Level of mind low. Ill since childhood. Hemoglobin: 9 °/o. Red blood corpuscles 980.000 mmc. Eggs of ancylostomidae in fesce. R. WASSERMANN negative.

XI.—M. R. Reg. A. 266.—Sex: Masculine.—Age 15.—White. Faintness. Discouloured face. Slight edema of inferior limbs. Discoloured mucosae. Arterial tension: max. 11 and mn. 6. Hemoglobin 34 %. Red corpuscles 1;920.000 mm³. Treatment by chenopodium: Hemoglobin: 62 %. R. WASSERMANN: negative.

XII.—F. A. Reg. 3157. Age: 12 years. White. Weariness.—Faintness. Face and mucosae pale. Geophagy. Arterial tension: max. and mn 4 1/2. Cardiac area increased. Mesostylic breath. Hemoglobin: 40 o/o.—Red corpuscles 3.100.000 mm3. Hookworm eggs in fesce and traces of albumin. R. WASSERMANN: negative.

XIII. A. M. S. Reg. A. 249.—Age 15.- Sex: Masculine. Metis. Brazilian. Advanced state of weariness. No power of working, getting directly exhausted. Has always been ill. Pale colour. Discoloured mucosae. as also the lips. Had edema of inferior limbs. Mesostylic breath. Cardiac area increased. Arterial tension: max. 11 and mn. 6. Eggs of ancylostomae, scarcely of Trichocephalae. Traces of albumin in urin. Hemoglobin: 18 %. Re corpuscles: 2.200.000 mm3. R. WASSERMANN; negative.

XIV.—S. E. S. Brazilian. White. Age 24 years.—Sex: Masculine. Very marked paleness, wax-like.—Strongly discoloured mucosae. Edema in the face. Big edema in inferior limbs. Slight ascitis. Dyspnea. Arterial tension: max. 11. Minimum tension: 5. Large increase of cardiac area. Distended liver Hemoglobin 15 o/o. Red corpuscles: 1.160.000 mm3. R. WASSERMANN: negative.

CONCLUSIONS:

I. Calcium shows only slight variation.

II. Potassium, in most cases, showed low figures. The proportion K/Ca varied from 1.7 to 2,3 being the normal 1,9.

III. In severe cases, sodium chloride showed high amount (cases: I, III, VI, V, VIII, X and XIV). Cholesterol showed steadily high figure.

IV. -Total proteins lower according to the severeness of cases.

V.—The elements above referred to get back to normal percentages; consequently to antihelminthic treatment.

LITERATURE

1. KRAMER and TISDALL—Jour. of Biol. Chem. Vol. 46 1921 p. 339.
2. SACKETT—Id. Vol. 64 1925 p. 205.
3. NORGAARD and GRAM—Id. Vol. 46 1921 p. 263.
4. MYERS and SHORT—Id. Vol. 48 1921 p. 83.
5. KAUFTHEIL and KISH—Klin. Wochensch. Vol. 6 1927 p. 1328.
6. DENIS and HOBSON—J. Biol. Chem. Vol. 55 1923 p. 183.
7. EUGSTER—Z. f. Klin. Med. Vol. 107 1928 p. 224.
8. MYERS—Practical Chemical Analysis of Blood 1924.
9. ROBERTSON—J. of Biol. Chem. Vol. 22 1918 p. 233.
10. VAN SLYKE—Id. Vol. 68 1921 p. 153.
11. VILLELA (G. G.) Sciencia Medica 1928 Março.

TABLE N. 2

CASES	NAMES	Calcium in mgr. per 100 c.c.	Potassium in mgr. per 100 c.c.	Proportion K/Ca	Chlorides in mgr. per 100 c.c.	Cholesterol in mgrs. per 100 c.c.	Total proteins in gr. per 1.000 c.c.	Alkali Reserve in c.c. of CO^2 at 0° 760 mm.	Hemoglobin (Gowers-Sahli)	Red blood corpuscles per mm^3
I	J. R.	10,8	19,3	1,7	643	260	75	——	66 o/o	3,632,000
II	O. (a)	8,0	16,3	2,3	480	130	61	——	45 o/o	2,900,000
	O. (d	10,1	18,1	1,8	450	174	87	——	75 o/o	3,280,000
III	S. P. (a)	8,6	18,0	2,1	620	135	82	——	28 o/o	2,940,000
	S. P. (d)	9,9	— —	——	538	—	89	——	57 o/o	4,120,000
IV	J. J. C. (a)	10,0	17,4	1,7	538	220	80	——	16 o/o	1,286,000
	J. J. C. (d)	10,0	18,1	1,8	520	164	93	——	74 o/o	3, 20,000
V	J. T. (a)	10,1	19,8	1,9	586	250	75	——	29 o/o	1,760,000
	J. T. (d)	10,2	20,1	1,9	580	176	89	——	70 o/o	3,832,000
VI	C. J. M.	10,1	22,3	2,1	620	244	75	— —	19 o/o	2,460,000
VII	J. P. (a)	9,0	17,2	1,9	420	240	65	68,3	21 o/o	2,100,000
	J. P. (d)	10,2	18,4	1,8	520	220	82	57,9	—	——
	J. P. (d)	10,4	18,3	1,7	510	200	86	58,3	75 o/o	4,250,000
VIII	B. R.	9,4	18,1	1,9	640	200	70	59,3	15 o/o	1,430,000
IX	L. (a)	10,0	19,3	1,9	604	226	55	65,1	32 o/o	2,320,000
	L. (d)	10,3	18,6	1,8	580	220	80	50,4	68 o/o	3,420,000
X	M. R. (a)	9,7	16,7	1,7	610	198	81	56,3	34 o/o	1,920,000
	M. R. (d)	9,9	18,4	1,8	549	160	83	54,1	62 o/o	——
XI	M. (x)	7,9	17,8	2,2	549	178	59	46,1	9 o/o	980,000
XII	F.	9,5	18,0	1,9	596	200	84	62,0	40 o/o	3,100,000
XIII	A.	10,1	17,7	1,7	580	220	76	61,6	18 o/o	2,200,000
XIV	J. E. S.	8,9	19,3	2,1	653	180	60	70,2	15 o/o	1,160,000

Intranuclear inclusions in experimental yellow fever

By C. MAGARINOS TORRES.

Examining (1) liver sections from forty-three *Macacus rhesus* inoculated with yellow fever virus (Brazilian (2) and African (3) strains) I found acidophilic intranuclear inclusions (figs. *f*, *g*, *h*, *i*, *j* and *k*) in thirty-one of them.

They were observed still in two injected *M. cynomolgus*, animals whose receptiveness to yellow fever virus was first demonstrated by ARAGÃO (Brasil-Medico, July 7, 1928).

The inclusions were not evidenced, on the other hand, in the liver from six uninoculated *rhesus* monkeys as well as from nine *rhesus* injected with miscellaneous material, *e. g.*, liver from yellow fever patient, NOGUCHI's medium inoculated with virus (several passages), *Bacillus typhosus* culture, etc..

Plate 1 represents besides acidophilic intranuclear inclusions just mentioned, non specific nuclear changes (figs. *b*, *c*, *d* and *e*) dependent on the necrobiosis of the liver cell and which were observed in injected as well as in uninoculated animals. Special reference to them is made here on account of the presence inside the nucleus of eosin-staining substances.

Such cytological minutiae shall be appreciated in well preserved tissues and well stained sections; the study of frozen sections, except in animals where inclusions appeared very abundant, has given untrusty results and it was found that postmortem changes render specially difficult the recognition of inclusions when scarce.

Fig. *a* represents two normal liver cells from uninoculated *rhesus*. The nuclei measure respectively 6 μ 7 by 6 μ 7 and 7 μ by 6 μ 7, the dimensions being the average ones, as rather larger nuclei are at times to be found in some specimens. Chromatin granules appear larger and more numerous at the vicinity of the nucleoli and of the nuclear membrane. No other eosin-staining substance beyond the excentric true nucleolus appears inside the nucleus of a normal liver cell of the *rhesus*.

The nuclei in figs. *f* and *g* is somewhat enlarged as compared with fig. *a*, measuring respectively 7 μ 6 by 7 μ 9, and 8 μ by 7 μ 6, showing as characteristic change the acidophilic mass which is single, presents a semilunar shape and lies at the centre, being well distinct from the nucleolus and separated from the nuclear membrane by a clear area. In early stages of oxychromatic degeneration (figs. *f*, *g* and *h*) chromatin granules

(1) By courtesy of Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO, A. MARQUES DA CUNHA and J. MUNIZ.

(2) From different sources (yellow fever patients at Rio de Janeiro).

(3) Virus sent from New York to B. ARAGÃO.

somewhat smaller than in normal nucleus occur; they become entirely absent, however, in later stages (figs. *i*, *j* and *k*) when an empty, structureless space surrounds the acidophilic inclusion, the only substance demonstrable inside the nucleus.

Fig. *h* represents a "butterfly-like" intranuclear inclusion, a frequent and characteristic picture in monkeys injected with the Brazilian strains (several sources); therefore I was not able to find such stages in the few animals I examined of the African strain series. With regard to the absence of nucleolus in this figure, the plane of sectioning accounts probably for it.

In figs. *i*, *j* and *k* the nuclei are distinctly enlarged measuring respectively 9 μ 5 by 7 μ, 8 μ by 7 μ 6 and 11 μ 4 by 8 μ 5. Nucleolar substances staining dark violet are to be seen either inside the acidophilic inclusions themselves (figs. *i* and *j*) or in their vicinity (fig. *k*); the basichromatin disappears from the inside of the nucleus, condensing itself upon the nuclear membrane where it forms rod-like structures, sometimes separated by a very thin strand of pinkish material which marks the outline of the nucleus.

Moreover, the inclusions are not homogeneous and hyaline in structure but appear more or less granular (figs. *j* and *k*); the more compact the inclusion is, the more intense is its coloration by eosin.

Of course, all liver cells represented in the Plate show fat vacuoles at the cytoplasm besides oxychromatic degeneration.

Figs. *b*, *c*, *d* and *e* represent early stages in necrobiosis of liver cell. Inside the nucleus stained uniformly and at times a deep blue, besides a violet stained granule (nucleolus?) and eosin-staining material, no chromatin granule is visible (*chromatolysis*). The eosin-staining substances form sometimes a ring around the basophilic granule (figs. *d* and *e*); in figs. *b* and *c* the acidophilic material is somewhat diffuse and indistinct.

As a rule, such nuclei are not enlarged, measuring in average 7 μ 9 by 6 μ 6 and although containing acidophilic masses, are sharply distinguishable from those presenting oxychromatic degeneration by the shape and appearance of the eosin-staining substance as compared with the nuclear inclusions, in addition to the diffuse deep blue staining and chromatolysis of the nucleus.

The yellow fever inclusions are confined strictly to the interior of the nucleus, figs. *f*, *g* and *k* showing that they are distinct from the nucleolus, a fact better evidenced in preparations stained with carbol-fuchsin and counter-stained with LOEFFLER's methylene blue and differentiated in alcohol. The nucleoli may appear intensely red in such preparations, while the yellow fever bodies appear blue or blue-violet.

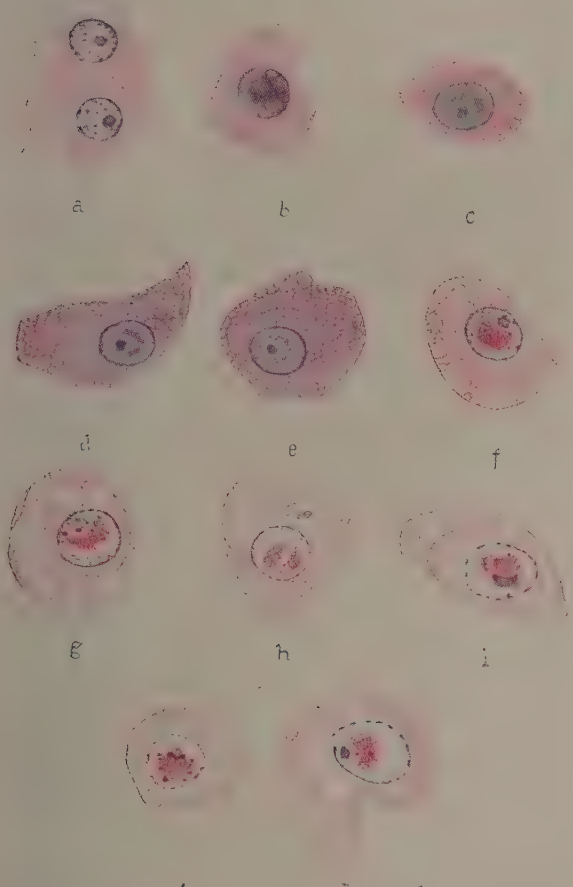
The material composing the inclusions is readily distinguishable from nuclear chromatin in liver sections submitted to FEULGEN's Nuclealfärbung (4); in them, while the chromatin staining blue is found deposited upon the nuclear membrane, the yellow fever bodies remain unstained.

As is the case with herpes, it seems evident that the material which constitutes the yellow fever "inclusions" may partially at least be compo-

---

(4) FEULGEN, A. Die Nuclealfärbung in Abderhalden: Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Lief. 213, 1926, S. 1055 u. 1071.

C. MAGARINOS TORRES – Intranuclear inclusions in experimental yellow fever (Brazilian strain).



A. Leal del

Liver cells of *M. rhesus*. Helly's fixative ; hematoxylin-eosin stain ; Zeiss 1/12 im. and oc. comp. 6.

Fig. *a* represent a normal liver cell.

Figs. *b—e* show necrobiotic (non-specific) nuclear changes.

Figs. *f—k* represent characteristic nuclear changes; the inclusions are represented by the pink intranuclear masses.

Fig. *h* represents a "butterfly-like" body.

Figs. *i*, *j* and *k* show the end stages of oxychromatic nuclear degeneration, as well as increase in the size of the nucleus (specially in *k*).

Figs. *f*, *g*, and *i* show acidophilic mass independent of nucleolus.

Typ. do Inst. Osw. Cruz

EXPLANATION OF PHOTOMICROGRAPHS

Figs. 1, 2, 3, 4, and 5 are photomicrographs, magnification 540 diameters, of liver sections from *rhesus* monkeys. HELLY's fixative; hematoxylin and eosin stain.

Fig. 1 represents normal structure of the nucleus from uninoculated *rhesus*. Some liver cells show fatty degeneration.

Figs. 2 and 3 represent acidophilic intranuclear inclusions at almost every liver cells from *rhesus* injected with yellow fever virus (Brazilian strain). "Entamoeba-like" and "butterfly-like" intranuclear inclusions are a common picture, the "granular stage" being less frequently found. Note in Fig. 2 two typical "butterfly-like" bodies. These figures also show absence of necrotic liver cells.

Figs. 4 and 5 represent acidophilic intranuclear inclusions at liver cells from *rhesus* injected with yellow fever virus (African strain).

Note in fig. 4 hypertrophy of nuclei presenting acidophilic granules and liver cells with "entamoeba-like" intranuclear bodies and in fig. 5 the remarkable amount of basichromatin condensed over the nuclear membrane. Round-shaped necrotic liver cell is evident in fig. 5.

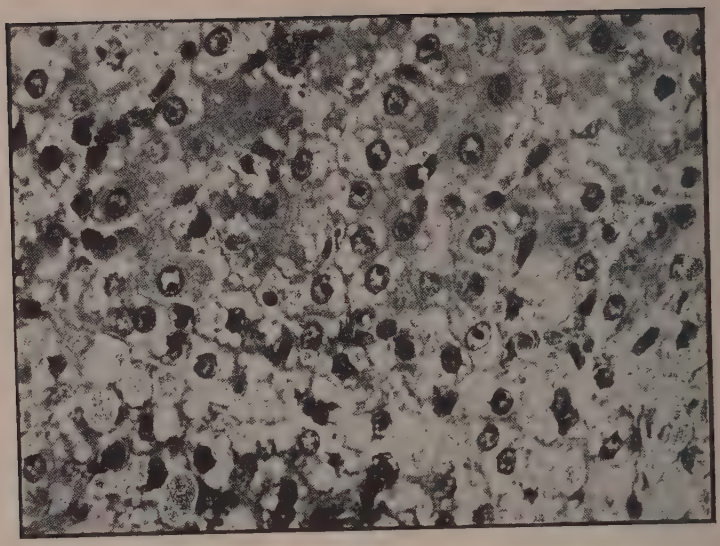


Fig 1

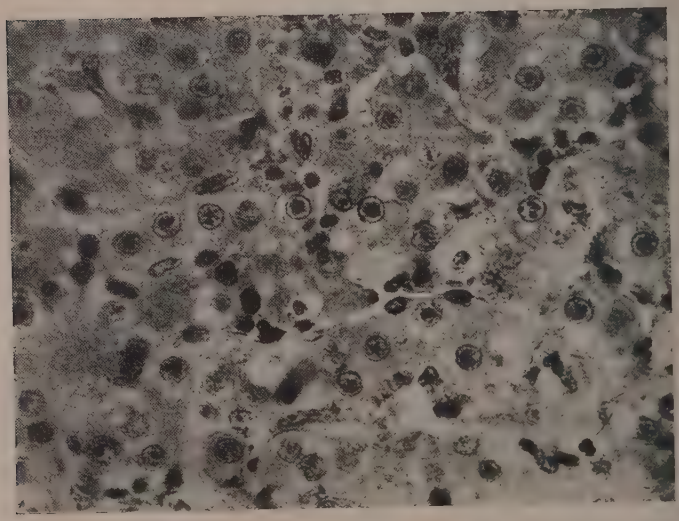


Fig. 2

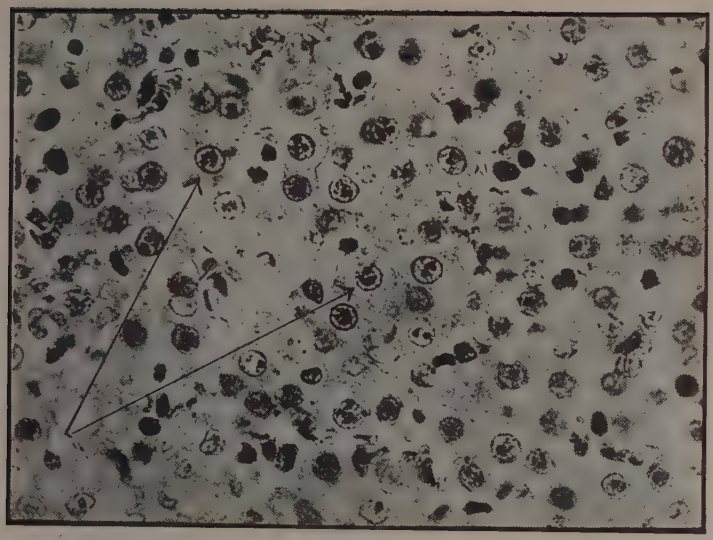


Fig. 3

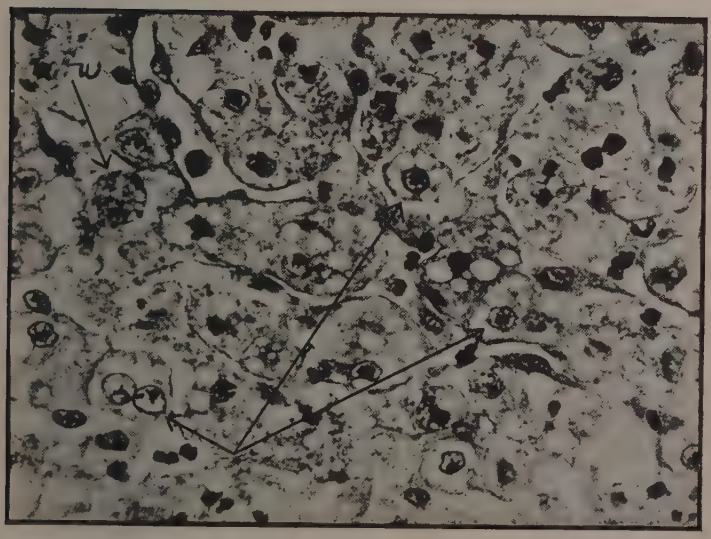


Fig. 4

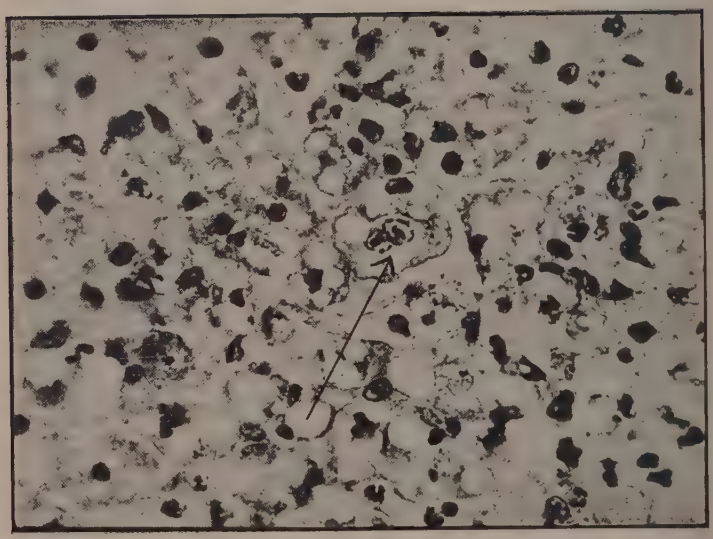


Fig. 5

sed of coagulated nucleoplasm, being surely of a different structure and composition from the two nuclear constituents, chromatin and nucleolus.

It is not definitely known whether the "inclusions" in virus diseases are purely degenerative in nature (*reaction products*) produced by the cell in response to injury or are composed in part at least of the specific virus itself. Nevertheless a desirable work, as emphasizes GOODPASTURE, will be that directed towards "recognizing a constant association of a characteristic type of inclusion with any particular infection, and by identifying it with the lesion so that a diagnosis of the infection on this basis may be possible" (Amer. Jour. of Pathology, 1925, vol. 1, n. 1, pag. 2).

In fact, it was with this object in view that the pathology of experimental yellow fever have been considered in my late papers (5).

Finally, it has appeared that if acidophilic intranuclear inclusions (oxychromatic degeneration) occur both in monkeys infected with the Brazilian and in those with the African strains I was able to examine, discrepancies actually exist between the structure of the inclusion itself or the appearance of recognizable nuclear constituents in both series. They are as follows:

1. In liver cells from monkeys of the African strain series the acidophilic intranuclear material frequently presents itself subdivided in minute masses or granules as reported by STOKES, BAUER and HUDSON (Amer. Jour. of Trop. Med., 1928, vol. VIII, n. 2, pg. 157) and by HUDSON (Amer. Jour. of Pathology, 1928, vol. IV, n. 5, pg. 409); that "granular stage" (evidently an early one) is not so abundant in liver sections from monkeys of the Brazilian strain series, and above all the fragmentation of the acidophilic intranuclear material never is so marked, the granules being there less numerous and generally larger than in the African strain series.

2. In liver cells from monkeys of the Brazilian strain series the "butterfly-like" intranuclear figure (fig. *h*) is a common aspect in early stages of oxychromatic degeneration; such figures are surely not abundant in liver sections from the animals of the African strain series I could examine, and in fact I was unable to demonstrate in such sections "butterfly-like" bodies exactly similar to those recorded in monkeys injected with the Brazilian strain.

3. The amount of basichromatin that becomes marginated forming thick rods over the nuclear membrane at liver cells with intranuclear bodies is apparently more considerable in *rhesus* from the African strain series (predominance of later stages of oxychromatic degeneration?) than in those from the Brazilian strains series (predominance of early stages of oxychromatic degeneration?).

It is believed that differences in the virulence and adaptation of the two strains to *Macacus rhesus* expressed on the other hand by slight necrosis of liver cells at one series (Brazilian strains) and marked necrosis at another (African strain) may account for such discrepancies and surely further data are needed before definite conclusions may be stated as far as differences at nuclear changes in both series are concerned.

---

(5) Brasil-Medico, 1928, n. 36, pg. 1001, Sciencia Medica, 1928, n. 9, pg. 427. Mem. Inst. Osw. Cruz, Supl. n. 2, pg. 55, C. R. Soc. Biol, 1928, T. XCIX, pgs. 1655, 1660, 1669 and 1671.

Electrocardiogramma na Febre Amarella

Pelos Drs. EVANDRO CHAGAS e LINCOLN DE FREITAS.

(Hospital Oswaldo Cruz).

As alterações do electrocardiogramma na Febre Amarella se mostram sufficientemente constantes para merecerem um estudo especial. São mais ou menos profundas de accordo com a gravidade da infecção e bastam em geral para estabelecer o prognostico.

Nos casos que evoluem para a cura, raramente são vistos signaes de degeneração do musculo cardiaco. Observam-se apenas alterações consequentes á influencia do systema vago-sympatico e nunca existem deformações dos complexos electricos. Nos casos mais graves e principalmente nos que caminham para a morte, não só se observam deformações e aberrações nas variações electricas, como tambem se encontram alterações progressivas de determinadas ondas, que correspondem á evolução do processo degenerativo do musculo e que muito bem podem ser acompanhadas pelo registro em serie dos electrocardiogrammas.

A bradycardia em seguida á phase agúda da infecção e mais frequentemente na convalescença, é constante nos casos não mortaes. As vezes muito pronunciada, caracterisa-se nos electrocardiogrammas não só pelo alongamento da diastole total, como tambem pelo augmento de duração de todas as manifestações electricas e do intervallo que as separa. A observação n. 1 é um exemplo typico do que acabamos de affirmar.

Em alguns casos, muito raros é verdade, a influencia do systema vago-sympatico conduz á dissociação auriculo-ventricular ou au rythmo nodal. Essas alterações são sempre transitorias e desapparecem com a cura. Deste facto se tem um exemplo na observação n. 2.

De certa frequencia são as deformações dos complexos auriculares e ventriculares consequentes á existencia de processos degenerativos do myocardio, e que conduzem a defeitos na transmissão do estimulo contractil pelos differentes elementos do coração. Algumas vezes esses signaes se evidenciam em formas clinicas de média ou de pequena gravidade e ahi, não são visiveis nem na convalescença nem na cura. Em geral, porém, elles só são encontrados nos casos graves e apparecem em periodo avançado da infecção. Pode-se considerar o seu apparecimento como de máo prognostico e apenas em um doente, no da observação n. 3, não foram o symptoma de uma morte, senão proxima pelo menos certa. Nas observações ns. 3 e 4 temos exemplos dessa affirmação.

Ainda significando processo de degeneração do musculo cardiaco observamos em casos de infecção grave e fatal, um aspecto peculiar do electrocardiogramma que sempre serviu para estabelecer o prognostico e a provavel evolução da doença. Esse aspecto é evidenciado nas curvas das observações 5, 6, 7, 8 e 9. A medida que a evolução se processa, muito antes mesmo do apparecimento de qualquer signal clinico alarmante, ob-

serva-se o augmento em todos os sentidos e em todas as derivações da onda T dos complexos ventriculares, com diminuição progressiva da extensão da onda R e alongamento dessa ultima. O intervalo inter-systolico tambem cresce e assim se vão progressivamente deformando os complexos ventriculares que assumem aspectos verdadeiramente bizarros nos periodos mais adeantados da infecção (Observações 7, 8 e 9).

Não só as variações ventriculares soffrem modificações; tambem a onda auricular é consideravelmente alterada embora em menor numero de individuos.

Na observação 7 além da grande deformação dos complexos auriculares e ventriculares e do augmento do intervalo inter-systolico (P—R) podiam ser vistas algumas horas antes da morte crises longas da tachycardia extra-systolisa heterotopicas dos ventriculos. Nas observações 8 e 9 de tal modo se deformaram todas as ondas do traçado que muito difficilmente podiam ser differenciadas. Cumpre assignalar na observação 8, que não só se deformaram os complexos ventriculares, como tambem as manifestações auriculares soffreram alterações pronunciadas. O aspecto do traçado nos poucos minutos que precederam a morte lembra e faz suppôr a existencia de um rythmo de origem heterotopica no ventriculo, mas a perfeita associação dos complexos ventriculares e auriculares traz a certeza da origem homotopica da excitação ventricular e da sua má conducção atravéz os elementos especificos.

O graphico da observação 9 lembra á primeira vista um rythmo de excitação heterotopica, mas comparando-o com os traçados obtidos na observação anterior somos levados a crêr se trate apenas de complexos ventriculares homotopicos profundamente deformados.

E' ainda interessante referir algumas observações colhidas no momento da morte. Essas verificações dão uma idéa perfeita do modo por que se acaba a funcção cardiaca na doença. As observações 8, 9, 10 e 11 são curiosos exemplos que convêm examinar.

Na totalidade dos doentes observados até a morte verificou-se a deformação dos complexos ventriculares acima assignalada. No momento final passaram sempre por um periodo de extrasystolia ventricular, periodo esse que em geral teve duração variavel e se seguiu de fibrilação do coração e parada immediata da contracção.

O electrocardiogramma na Febre Amarella nada tem de caracteristico ou de peculiar á infecção. Entretanto traduz de modo preciso todas as phases de degeneração por que possivelmente passa o musculo cardiaco, e essas alterações deveriam merecer um estudo anatomico mais perfeito. Constitue ainda um elemento util ao prognostico e muito aproveitavel á um melhor juizo da gravidade dos differentes casos submettidos á observação.

OBSERVAÇÕES.

Nº. 1. C. F., 34 annos. Mascuiino. Branco. Casado. Portuguez. Operario. Alta, curado no decimo terceiro dia.

1º Traçado. Phase agúda da infecção (Fig. 1). Rythmo normal levemente accelerado.

P—R = 0,10
P = 0,04
R—T = 0,24
R = 0,02
S = 0,01
T = 0,10

2º. Traçado. Convalescença da doença (Fig. 2). Rythmo normal muito lento.

P—R = 0,12
P = 0,06
R—T = 0,32
R = 0,04
S = 0,02
T = 0,12

Nº. 2. J. R. S., 22 annos. Masculino. Solteiro. Pardo. Africano. Operario. Alta, curado no decimo terceiro dia.

1º. Traçado. Phase agúda da infecção (Fig. 3). Arithmia respiratoria muito pronunciada com periodos de dissociação e outros de rythmo nodal.

Essa irregularidade se traduzia ora pela falta da associação P—R, ora pelo apparecimento de algumas excitações nodaes que são justamente representadas na figura 3. Assim o intervallo P—R dos tres primeiros cyclos é de 0,20 e a onda R méde nesses mesmos cyclos 1 mvt. e 7/10 mvt. Depois de uma phase diastolica mais longa o terceiro cyclo do traçado é de excitação nodal (porção mais alta do nodulo) com intervallo P—R de 0,04 e onda R com 1 mvt. e 9/10 de mvt. O 4º e o 5º cyclos do traçado são semelhantes aos tres primeiros e o 6º representa uma nova excitação nodal com intervallo P—R de 0,12, P com 2/10 mvt. e R com 1 mvt. e 7/10.

Neste caso eram vistas phases de franca dissociação auriculo-ventricular com bradirythmia ventricular até a 32 excitações por minuto, mas que infelizmente não forneceram graphico sufficientemente perfeito para publicação.

2º. Traçado. Convalescença da doença. Rythmo normal. Intervallo inter-systolico permanente em 0,20 (Fig. 4).

Nº. 3. M. F., 18 annos. Feminino. Solteira. Parda. Brasileira. Cozinheira. Alta, curada no vigesimo dia.

1º. Traçado. Phase agúda da infecção (Fig. 5). Rythmo normal. Ligeira tachicardia febril.

P—R = 0,08
P = 0,04
R—T = 0,30
R = 0,02
S = 0,01
T = 0,12

2º. Traçado. Passada a phase agúda da infecção. Observavam-se com frequencia complexos ventriculares do typo nodal mas de conducção inteiramente anormal. Além disto os proprios complexos sinusaes se haviam modificado. Assim,

P—R = 0,12
P = 0,06
R = 0,02
R—T = 0,32
T = 0,12
S = 0

Os complexos deformados deste periodo mediam

R = 0,08
R—T = 0,40
T = 0,16
P—R = 0,02

A extensão da onda R no traçadó da figura 5 é de 1 mvt. e 1/10 mvt. e na figura 6 de 8/10 mvt. As ondas R dos complexos aberrantes não tinham senão 5/10 mvt.

Nº. 4. H. B. 36 annos. Masculino. Casado. Branco. Inglez. Gravadór. Obito no oitavo dia da molestia.

1º. Traçadó no quinto dia de molestia (Fig. 7). Rythmo regular.

DI	DII	DIII
P = 0,04 2/10 mvt.	P = 0,06 2/10 mvt.	P = 0,06 2/10 mvt.
P—R = 0,12	P—R = 0,12	R = 0,02 4/10 mvt.
R = 0,02 3/10 mvt.	R = 0,02 4/10 mvt.	S = 0,02 3/10 mvt.
S = 0,02 5/10 mvt.	S = 0,03 4/10 mvt.	R—T = 0,24
R—T = 0,24	R—T = 0,20	T = 0,04 1/10 mvt.
T = 0,12 2/10 mvt.	R = 0,08 3/10 mvt.	T—P = 0,14
T—P = 0,14	T—P = 0,14	

Na occasião em que foi obtido este mesmo traçado o estado clinico do doente era já evidentemente sério, porem o prognostico ainda muito incerto. Já se notava então o desenvolvimento pronunciado da onda T.

2º. Traçado no setimo dia de molestia (Fig. 8).

DI	DII	DIII
P = Duplo 0,08 1/10 mvt.	P = 0,08 2/10 mvt.	P = 0,08 Duplo
P—R = 0,14	P—R = 0,16	P—Q = 0,16
R = 0,02 3/10 mvt.	R = 0,02 3/10 mvt.	Q = 0,02 2/10 mvt.
S = 0,08 6/10 mvt.	S = 0,08 2/10 mvt.	R = 0,08 6/10 mvt.
R—T = 0,30	R—T = 0,28	Q—T = 0,28
T = 0,12 5/10 mvt.	T = 0,12 4/10 mvt.	T = 0,08 1/10 mvt.
T—P = 0,06	T—P = 0,05	T—P = 0,06

Neste caso a medida que se agravaram os symptomas e que o doente se aproximou da morte surgiram signaes de conducção defeituosa nos ventriculos, principalmente no ventriculo esquerdo.

No. 5. O. P., 22 annos. Masculino. Solteiro. Branco. Brasileiro. Operario. Morte no oitavo dia.

1o. Traçado feito na vespera da morte (Fig. 9). Rythmo regular bastante accelerado. Já se notava o grande augmento da onda T e deficiencia de conducção nos ventriculos. Estes signaes se exageraram no dia immediato, horas antes da morte.

DI	DII	DIII
P = 0,02 2/10 mvt.	P = 0,08 2/10 mvt.	P = 0,02 2/10 mvt.
P—R = 0,10	P—R = 0,12	P—R = 0,12
R = 0,02 3/10 mvt.	R = 0,06 8/10 mvt.	R = 0,06 6/10 mvt.
S = 0,02 1/10 mvt.	S = 0,06 4/10 mvt.	S = 0,06 4/10 mvt.
R—T = 0,24	R—T = 0,24	R—T = 0,24
T = 0,08 3/10 mvt.	T = 0,08 8/10 mvt.	T = 0,12 6/10 mvt.
T—P = 0,12	T—P = 0,10	T—P = 0,10

2o. Traçado (Fig. 10).

DI	DII	DIII
P = 0,08 2/10 mvt.	P = 0,08 2/10 mvt.	P = 0,08 1/10 mvt.
P—R = 0,12	P—R = 0,10	P—R = 0,10
R = 0,04 8/10 mvt.	R = 0,04 7/10 mvt.	R = 0,06 8/10 mvt.
S = 0,08 6/10 mvt.	S = 0,08 5/10 mvt.	S = 0,06 6/10 mvt.
R—T = 0,24	R—T = 0,24	R—T = 0,26
T = 0,08 7/10 mvt.	T = 0,10 9/10 mvt.	T = 0,12 8/10 mvt.
T—P = 0,08	T—P = 0,08	T—P = 0,08

No. 6. E. O., 30 annos. Masculino. Casado. Russo. Operario. Morte no quinto dia de molestia.

1o. Traçado no terceiro dia de molestia (Fig. 11). Rythmo regular.

DII
P = 0,06 2/10 mvt.
P—R = 0,12
R = 0,02 3/10 mvt.
S = 0,02 4/10 mvt.
R—T = 0,28
T = 0,08 3/10 mvt.
T—P = 0,12

2º. Traçado obtido quatro horas antes da morte (Fig. 12).

DII

P = 0,08 2/10 mvt. Duplo
P—R = 0,12
R = 0,02 3/10 mvt.
S = 0,04 7/10 mvt.
R—T = 0,28
T = 0,12 7/10 mvt.
T—P = 0,06

Neste caso appareceram igualmente signaes de degeneração do musculo cardiaco.

Nº. 7. J. M., 33 annos. Masculino. Casado. Branco. Brasileiro. Lenhador. Morte no Sexto dia de molestia.

1º. Traçado no quarto dia de doença. Rythmo regular, ligeiramente accelerado (Fig. 13). O traçado tirado no quinto dia, mostrava já um augmento consideravel na extensão da onda T e uma diminuição sensivel na de R. O intervallo P—R de 0,12 havia já passado a 0,16. No dia immediato, isto é, no sexto dia pela manhã, estes signaes se haviam ainda mais accentuado (Figs. 15 e 16), e o rythmo era frequentemente interrompido por crises mais ou menos longas de excitações heterotopicas ventriculares sommadas, verdadeiras crises de tachycardia extra-systolica parocystica.

E' curioso notar que por um curto periodo depois das crises de tachycardia a amplitude da onda T era consideravelmente reduzida (Fig. 17). A figura 18 representa o traçado feito minutos antes da morte.

Nº. 8. J. 13 annos. Masculino. Pardo. Brasileiro. Profissão ignorada.

O doente não prestou nenhuma informação quanto aos dias de doença com que entrou para o Hospital. Permaneceu internado apenas algumas horas e falleceu em seguida.

1º. Traçado feito no momento da entrada (Fig. 19). Tachycardia grande. Temperatura 37º,2. Grande augmento da onda T, que se mostrava mais elevada do que R.

2º. Traçado feito duas horas antes da morte, quando o doente era tomado de grande agitação e vomitava sangue abundantemente. O traçado mostra uma onda R enormemente reduzida, onda P dupla deformada e muito ampla e a onda T, a maior de todas, consideravelmente crescida em relação ao traçado anterior (Fig. 20).

A figura 21 representa o graphico feito no momento da morte. Os complexos auriculares são alargados e deformados e os complexos ventriculares profundamente aberrantes, lembrando o typo das variações consequentes a excitação heterotopica dos ventriculos. Entretanto por comparação com os traçados obtidos nesta mesma phase e em phases menos avançadas, de outros individuos, acreditamos representem elles a propria excitação homotopica profundamente prejudicada em sua transmissão.

No. 9. I. S. L., 4 annos. Feminino. Branca. Brasileira.

Permaneceu no Hospital apenas tres horas, tendo fallecido em seguida. Não foram obtidas informações quanto aos dias de molestia. Entrou em estado grave, com vomitos sanguineos muito frequentes e durante todo o tempo de permanencia no hospital teve o rythmo representado na figura 22. Ahi se vê um traçado semelhante ao da figura 20, apenas com rythmo mais accelerado. As grandes ondas representam as variações T dos complexos ventriculares e as pequenas alças que as precedem immediatamente são as variações R dos mesmos complexos. As manifestações auriculares P se acham fundidas ao ramo descendente de cada uma das ondas T.

No. 10. A. S. 19 annos. Masculino. Branco. Brasileiro. Operario e solteiro. Morte no sexto dia de molestia.

O estado geral deste doente se mostrou relativamente bom até ao quinto dia. O 1º. traçado (Fig. 23) foi feito no 4º dia de molestia e mostra um doplo P em DII. No mais elle é perfeitamente normal. No 5º dia de molestia foi feito o traçado da figura 24. Já ahi se via o grande augmento da onda T e diminuição sensivel da onda R. A variação auricular P se mostrava irregular, ora positiva, ora negativa. No 6º dia, momentos antes da morte, foram colhidos os traçados das figuras 25, 26 e 27. A figura 25 mostra um rythmo regular, lento com os complexos ventriculares de typo inteiramente anomalo e os complexos auriculares duplos e negativos. O traçado da figura 26, de alguns minutos antes da morte, é representativo da mesma alteração responsavel pelos complexos da figura 25, porem em phase mais avançada. No momento da morte a deformação das variações electricas do ventriculo se accentuou ainda mais até ao apparecimenfo da fibrilação que se seguiu da parada do coração (Fig. 27).

No. 11. J. A. 40 annos. Masculino. Casado. Branco. Portuguez. Operario. Morte no sexto dia.

O 1º traçado feito no terceiro dia de molestia com o estado geral bom era perfeitamente normal (Fig. 28). No sexto dia, depois de na vespera haverem surgido symptomas francos de insufficiencia cardiaca, os traçados tomaram o aspecto da figura 29; manifestações ventriculares muito reduzidas com a onda T diphasica. Este aspecto se manteve até a uma crise symcopal com apnéa que marcou o momento da morte. Nesta occasião o electrocardiogramma passou successivamente pelos aspectos representados nas figuras 30, 31, 32 e 33. A principio excitações ventriculares completamente anomalas que se foram tornando cada vez mais deformadas até ao apparecimento de um rythmo lento e unifocal dos ventriculos, seguido immediatamente da fibrilação e da morte.

Electrocardiogram in Yellow Fever

By Dr. EVANDRO CHAGAS & Dr. LINCOLN DE FREITAS.

(Oswaldo Cruz Hospital).

The variations of Electrocardiograms in Yellow Fever show a sufficient frequency to deserve a special study. They are more or less high, according to the severeness of the cases, and are generally sufficient to establish prognosis.

In cases which evolve toward cure, signs of degenerative processes of the cardiac muscle are rarely seen. Hardly some changes inherent to the influence of the vago-sympathetic system are observed, and never deformations of electrical complexes arise. In more severe incidences, chiefly in those which end in death, not only deformations and aberrations in the electric variations, but also progressive changes of determined waves are observed, the same corresponding to the degeneration process of the muscle. They can easily be accompanied by registration "en série" of Electrocardiograms.

Bradycardia, following the acute stage of the infection, chiefly convalescence, is always existing in unmortal cases. Sometimes highly emphasized, it is characterized in the Electrocardiogram, not only by the lengthened form of total diastole, as also by the increase of duration of all electric phenomenons and the interval which separates them. Observation N. 1 is a typical example of the above mentioned.

In some cases, scarce indeed, the influence of the vago-sympathetic system leads to auriculoventricular dissociation or to nodal rhythm. Such changes are always timely and disappear with the cure. Of this fact, observation 2 gives a striking example.

Rather frequent are deformations of auricular and ventricular complexes, consequent to degenerative processes of the myocardium, these changes leading to defficiency in the transmission of the contractile stimulus, by the different components of the heart. Sometimes such signs are obvious in clinical forms of middle or mild aspect, and there, they appear neither in the course of convalescence nor after the cure. Generally, however, they are found only in severe cases and appear at a certain stage of the infection. Their appearing can be deemed a bad prospect, as only in a single patient, that of observation N. 3, they did not mean to be a sure symptom of, if not impending, at least, a certain death. Observations 3 and 4 are examples of this affirmation.

Still as a meaning of a degenerative process of the cardiac muscle, we observed in cases of severe and fatal infection, a peculiar aspect of the electrocardiogram, which we always used to determine prognosis and probable evolution of the illness. This aspect is emphasized in the curves of observations N. 5, 6, 7, 8 and 9. As long as evolution is going on, even a long time before appearing any alarming clinical symptoms, one may

observe the increase in every direction and in all leads, of the T wave of ventricular complexes, with steady decrease in the extension of R wave and lengthening of the latter. The intersystolic interval also increases, so as to progressively deform the ventricular complexes which take really queer aspects in more advanced stages of the infection (Observations ns. 7, 8, and 9).

Not only ventricular variations are subject to changes; the auricular wave also is highly altered, however in a smaller number of patients.

In observation N. 7, beside a big deformation of the auricular complexes, and the increase of the intersystolic space (P - R), a few hours before the death, long crisis of extrasystolic heterotopic tachycardia of the ventricle could be observed.

In observations Ns. 8 and 9, the waves of the diagram were deformed in such a way, that differenciation could hardly be undertaken.

We must mention about observation N. 8, that, not only the ventricular complexes were deformed, as also auricular phenomenons had suffered serious alterations. The aspect of diagram, a few minutes before the death took place, would remind and even lead to think of the existence of a rhythm of heterotopic origin in the ventricle, but the thorough association of ventricular complexes brings a certainty of the homotopic origin of the ventricular excitation, and of its bad conductive power throughout the specific elements.

The graphic of observation N. 9 induces at first to believe in a rhythm of heterotopic excitation, but comparing it with diagrams obtained in the former observation, we should rather think, it means only a deep deformation of homotopic ventricular complexes.

It is also of interest to mention a few observations gathered by the time of death. These verifications give an exact idea of the way in which the cardiac function ceases in this illness. Observations Ns. 8, 9, 10 and 11 are very curious examples, which deserve examination.

In the whole number of patients observed till death, the above mentioned deformation of ventricular complexes took place. At the final moment, all of thens showed a period of ventricular extrasystoles, the said period having generally a variable duration and being followed by fibrillation of the heart and immediate stopping of the contractions.

The electrocardiogram in Yellow Fever has neither a characteristic nor a peculiar part to play with regard to the infection. It however registers in the most accurate manner, all stages of degeneration, which the cardiac muscle undergoes, and these alterations ought to deserve a more complete anatomical study. It means also an indication of some weight for prognosis, and a possibility of better judging the severeness of the various cases submitted to observation.

CLINICAL RECORDS.

N. I. C. F., 34 years old. Masculine. White. Married. Portuguese. Workman. Exeat, after cure on the 13th day.

1st. Diagram. Acute stage of the infection (fig. 1) normal rhythm slightly accelerated.

P—R = 0.10
P = 0.04
R—T = 0.24
R = 0.02
S = 0.01
T = 0.10

2nd. Diagram. Convalescent from the illness (fig. 2). Normal Rhythm very slow.

P—R = 0.12
P = 0.06
R—T = 0.32
R = 0.04
S = 0.02
T = 0.12

N. 2. J. R. S., 22 years old. Masculine. Unmarried. Mestiço. African. Workman. Exeat, cured on the thirteenth day.

1st. Diagram. Acute stage of the infection (fig. 3). Very deep respiratory arythmia, with periods of dissociation and other of nodal rhythm.

This irregularity was registered, at times, in the way of P—R dissociation, otherwise by the appearing of a few nodal excitations which are plainly shown in fig. 3. Thus, the interval P—R of the 3 first cycles is 0,20 and the wave R measures, in these same cycles, 1 mvt. and 7/10 mvt. After a longer diastolic stage, the third cycle of the diagram is 0,04 and the wave R with 1 mvt. and 9/10 mvt. The 4th and 5th cycles of the diagram are similar to the three first ones, the 6th showing a new nodal excitation with interval P—R equal to 0,12. P with 2/10 mvt. and R with 1 mvt. and 7/10 mvt.

In this incidency, stages of plain auriculoventricular dissociation with ventricular bradyrhythmia, could be seen, down to 32 excitations per minute, of which however we were unable to get a sufficiently plain graphic to allow being printed.

2nd. Diagram. Convalescent from the illness. Normal rhythm. The intersystolic interval remains permanent at 0,20 (fig. 4).

N. 3. M. F., 18 years. Feminine. Unmarried, mestiça. Brazilian. Cook. Exeat. Cured on the 20th day.

1st. Diagram. Acute stage of the illness. Normal rhythm. Slight febrile tachycardia:

P—R = 0.08
P = 0.04
R—T = 0.30
R = 0.02
S = 0.01
T = 0.12

2nd. Diagram. After the acute stage of the infection. Frequent ventricular complexes of the nodal type are observed, but of quite abnormal conductive power. Besides this, the sinusal complexes even had suffered a modification. Thus:

P—R = 0.12
P = 0.06
R = 0.02
R—T = 0.32
T = 0.12
S = 0

The deformed complexes of this period measured:

R = 0.08
R—T = 0.40
T = 0.16
P—R = 0.02

The extension of wave R in the diagram of fig. 5 is 1 mvt. and 1/10 mvt. and in fig. 6, 8/10 mvt. The waves R. of the aberrant complexes had but 5/10 mvt.

N. 4. H. B. 36 years Masculine. Married. White. English. Engraver. deceased on the 8th day of the illness.

1st. Diagram on the fifth day of the illness. (Fig. 7). Regular Rhythm.

DI	DII	DIII
P = 0.04 2/10 mvt.	P = 0.06 2/10 mvt.	P = 0.06 2/10 mvt.
P—R = 0.12	P—R = 0.12	R = 0.02 4/10 mvt.
R = 0.02 3/10 mvt.	R = 0.02 4/10 mvt.	S = 0.02 3/10 mvt.
S = 0.02 5/10 mvt.	S = 0.03 4/10 mvt.	R—T = 0.24
R—T = 0.24	R—T = 0.20	T = 0.04 1/10 mvt.
T = 0.12 2/10 mvt.	R = 0.08 3/10 mvt.	T—P = 0.14
T—P = 0.14	T—P = 0.14	

By the occasion in which this diagram was taken, the clinical condition of the patient was of course, already serious, but of still very uncertain prognosis. By then, the marked development of wave T was already noticeable.

2nd. Diagram on the seventh day of the illness (fig. 8).

DI	DII	DIII
P = Double 0.08 1/10 mvt.	P = 0.08 2/10 mvt.	P = 0.08 Double
P—R = 0.14	P—R = 0.16	P—Q = 0.16
R = 0.02 3/10 mvt.	R = 0.02 3/10 mvt.	Q = 0.02 2/10 mvt.
S = 0.08 6/10 mvt	S = 0.08 2/10 mvt.	R = 0.08 6/10 mvt.
R—T = 0.30	R—T = 0.28	Q—T = 0.28
T = 0.12 5/10 mvt.	T = 0.12 4/10 mvt.	T = 0.08 1/10 mvt.
T—P = 0.06	T—P = 0.06	T—P = 0.06

In this incidency, in proportion symptoms were becoming more serious, and the death was nearer, there appeared signs of defective conduction in the ventricles, specially of the left ventricle.

N. 5. O. P., 22 years. Masculine. Unmarried. White. Brazilian. Workman. Died on the eighth day.

1st. Diagram on the day before the death (fig. 9). Regular rhythm rather accelerated. One sees already a large increase of wave T and defficient conduction in ventricles. These signs become exaggerated on the following day, a few hours before death.

DI	DII	DIII
P = 0.02 2/10 mvt.	P = 0.08 2/10 mvt.	P = 0.02 2/10 mvt.
P—R = 0.10	P—R = 0.12	P—R = 0.12
R = 0.02 3/10 mvt.	R = 0.06 8/10 mvt.	R = 0.06 6/10 mvt.
S = 0.02 1/10 mvt.	S = 0.06 4/10 mvt.	S = 0.06 4/10 mvt.
R—T = 0.24	R—T = 0.24	R—T = 0.24
T = 0.08 3/10 mvt.	T = 0.08 8/10 mvt.	T = 0.12 6/10 mvt.
T—P = 0.12	T—P = 0.10	T—P = 0.10

2nd. Diagram (Fig. 10).

DI	DII	DIII
P = 0.08 2/10 mvt.	P = 0.08 2/10 mvt.	P = 0.08 1/10 mvt.
P—R = 0.12	P—R = 0.10	P—R = 0.10
R = 0.04 8/10 mvt.	R = 0.04 7/10 mvt.	R = 0.06 8/10 mvt.
S = 0.08 6/10 mvt.	S = 0.08 5/10 mvt.	S = 0.06 6/10 mvt.
R—T = 0.24	R—T = 0.24	R—T = 0.26
T = 0.08 7/10 mvt.	T = 0.10 9/10 mvt.	T = 0.12 8/10 mvt.
T—P = 0.08	T—P = 0.08	T—P = 0.08

N. 6. E. O., 30 years. Masculine. Married. Russian. Workman. Died on the fifth day of the illness.

1st. Diagram on the third day of the illness (Fig. 11). Regular rhythm.

DII

P = 0.06 2/10 mvt.
P—R = 0.12
R = 0.02 3/10 mvt.
S = 0.02 4/10 mvt.
R—T = 0.28
T = 0.08 3/10 mvt.
T—P = 0.12

2nd. A diagram obtained four hours before death (fig. 12).

DII

P = 0.08 2/10 mvt. Double
P—R = 0.12
R = 0.02 3/10 mvt.
S = 0.04 7/10 mvt.
R—T = 0.28
T = 0.12 7/10 mvt.
T—P = 0.06

In this case, signs of degeneration of the cardiac muscle did also appear.

N. 7. J. M., 33 years. Masculine. Married. White. Brazilian. Woodcutter. Died on the sixth day of the illness.

1st. Diagram on the fourth day of the illness. Regular rhythm slightly accelerated (Fig. 13). The diagram taken on the 5th day showed already a considerable increase in the extension of wave T, and a sensible decrease in R. The interval R—R of 0,12 had already grown up to 0,16 on the following day, say on the sixth day in the morning; these signs showed a still higher increase (Figs. 14—16), the rhythm being frequently interrupted by more or less long crisis of heterotypic ventricular excitations, summed up, real crisis of extrasystolic, paroxystic tachycardia.

Curious it is to note that, for a short period after the tachycardic crisis, the amplitude of wave T was considerably reduced (fig. 17). Fig. 18 shows diagram taken a few minutes before the death.

N. 8. J. 13 years. Masculine. Mestiço. Brazilian. Profession unknown. The patient did not give any information about the number of days he had felt ill before entering the hospital. He remained interned there a few hours only, died after that time.

1st. Diagram taken by the time of his admission (fig. 19) great tachycardy. Temperature 37,2. Great increase of wave T, which showed higher than R.

2nd. Diagram taken two hours before death, when the patient was seized by a great agitation and had abundant blood vomiting. The diagram shows a wave R exceedingly reduced; wave P twofold, deformed and very ample, and wave T, the greatest of all, considerably increased in relation with the foregoing diagram. (fig. 20).

Fig. 21 shows the diagram registered by the moment of the death. The auricular complexes are enlarged and deformed the ventricular complexes deeply aberrant, reminding the type of variations, subsequent to heterotopic excitation of the ventricles. Meanwhile, by comparing with diagrams obtained in the same stage, and at less advanced periods of other patients, we believe they represent the very homotopic excitation, deeply troubled in its transmission.

N. 9. I. S. L., 4 years. Feminine. White. Brazilian.

Remained in the Hospital for three hours only, and died after that time. No information about how many days of illness. Enteredin severe condition, with very frequent blood vomiting. During the whole permanency

in the hospital, showed the rhythm represented in fig. 22. There may be seen a diagram similar to that of fig. 20, but with more accelerated rhythm. The great waves represent the variations T of the ventricular complexes, and the small loops which are seen immediately in front of same are the variations R of the same complexes. The auricular phenomenons P, are mixed within the lowering branch of each one of the waves T.

N. 10. A. S;, 19 years. Masculine. White. Brazilian. Workman. Unmarried. Died on the sixth day of the illness.

The general condition of the patient was a relatively favourable up to the fifth day. The first diagram (ftg. 23) was taken on the fourth day of the illness and shows a double P in DII. In all, it is perfectly normal. On the fifth day of the illness, the diagram of fig. 24 was taken. There, already, the great increase of wave T and sensible decrease of wave R was noticeable. The auricular variation P showed irregular, at times positive, otherwise negative. On the sixth day, few moments before death, the diagrams of figs. 25, 26 and 27 were taken. Fig. 25 shows a regular rhythm, slow, with the ventricular complexes of quite abnormal type and the auricular complexes, double and negative.

The diagram of fig. 26, few minutes before death, show the same alteration which account for the complexes of fig. 25, however at a more advanced stage. By the moment of death, the deformation of the electric variations of the ventricle increased more and more till the appearing of fibrillation, foregoing to stop of the heart. (Fig. 27)

N. 11. J. A., 40 years. Masculine. Married. White. Portugueuse. Workman. Died on the sixth day.

The first diagram taken on the third day of infection, when general condition was rather favorable, was perfectly normal. (Fig. 28). On the sixth day, after plain symptoms of cardiac insufficiency had appeared the day before, the diagrams took the aspect of fig. 29. Ventricular phenomenons in great decrease, with wave T diphasic. This aspect prevailed up to a collapse crisis with apnea, meaning death coming on. By this opportunity, the electro-cardiograms took successively the aspects as shown in Figs. 30, 31, 32 and 33. At first the ventricular excitations, absolutely abnormal, growing little by little more deformed until a slow and unifocal rhythm of the ventricles appears, to which fibrillation and death immediately follow.

Fig. 1 DII

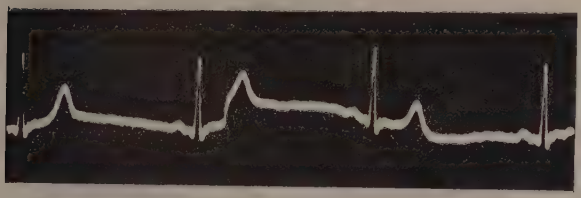


Fig. 2 DII

Fig. 3 DII

Fig. 4 DII

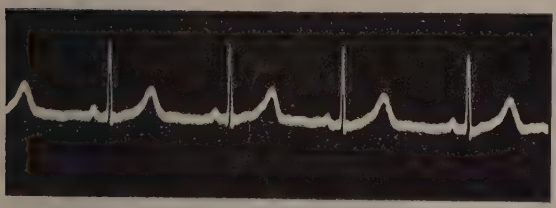


Fig. 5 DII

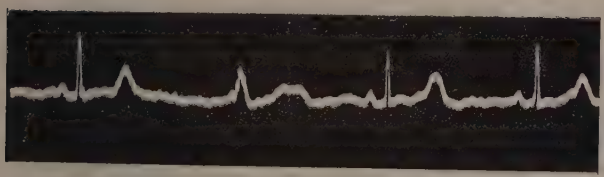


Fig. 6 DII

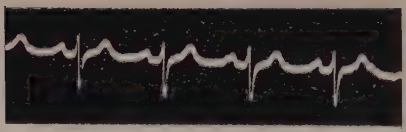


Fig. 7 DI

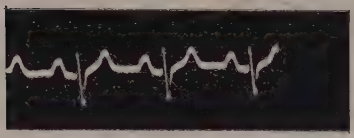


Fig. 7 DII

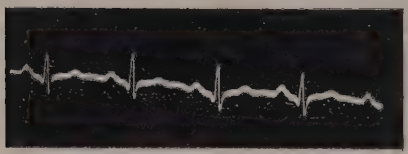


Fig. 7 DIII

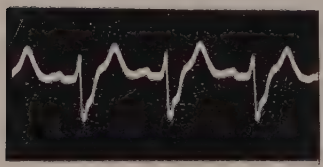


Fig. 8 DI

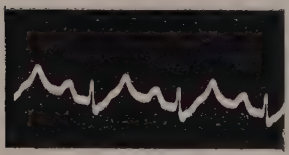


Fig. 8 DII

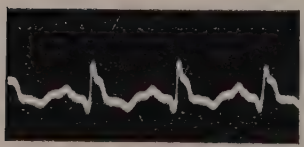


Fig. 8 DIII

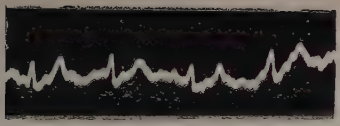


Fig. 9 DI

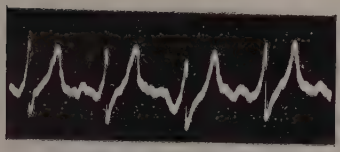


Fig. 9 DII

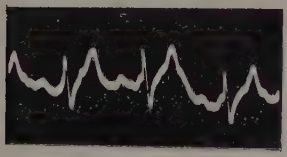


Fig. 9 DIII

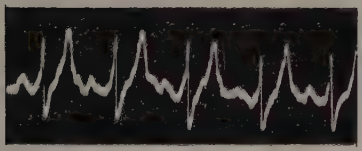


Fig. 10 DI

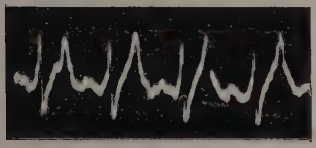


Fig. 10 DII

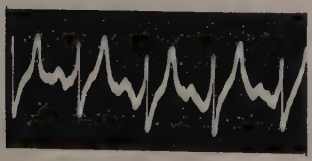


Fig: 10 D III

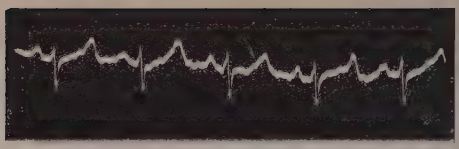


Fig. 11 DII

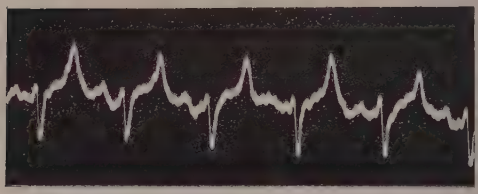


Fig. 12 DII

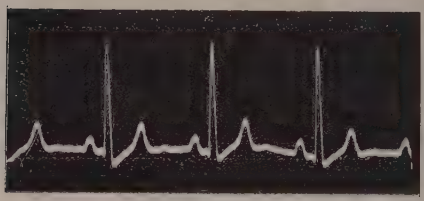


Fig. 13 DII

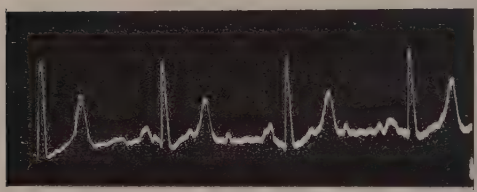


Fig. 14 DII

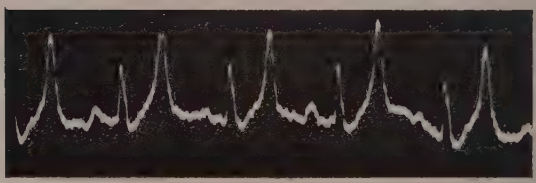


Fig. 15 DII

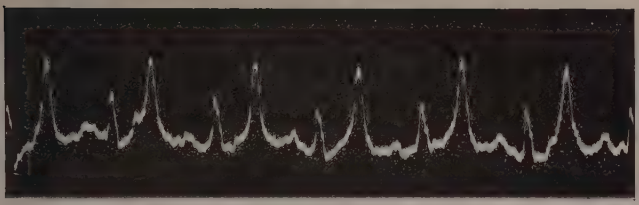


Fig. 16 DII

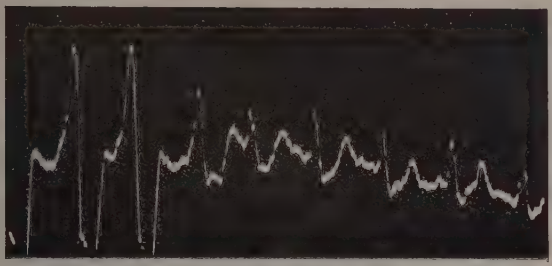


Fig. 17 DII

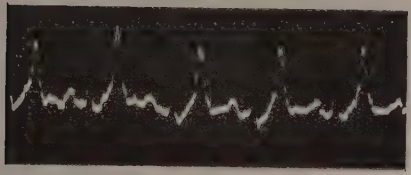


Fig. 18 DII

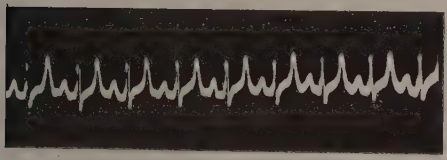


Fig. 19 DII

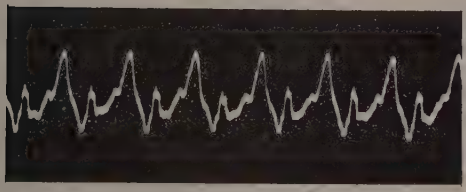


Fig. 20 DII

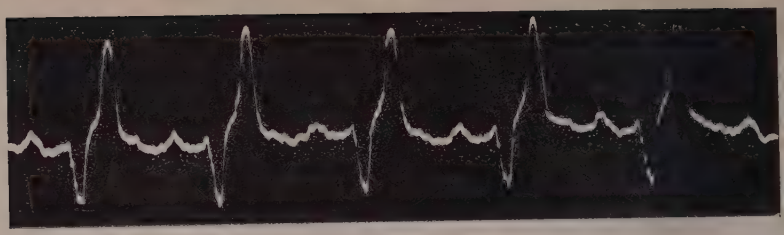
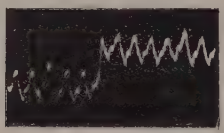


Fig. 21 DII



Fjg. 22 DII

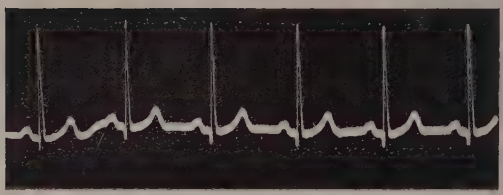


Fig. 23 DII

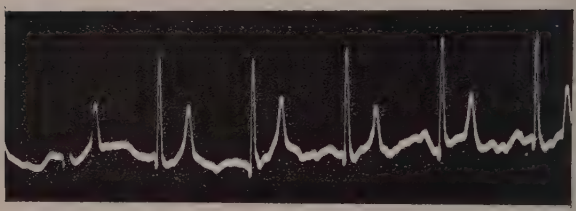


Fig. 24 DII

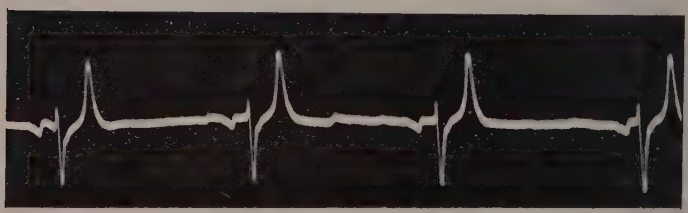


Fig. 25 DII

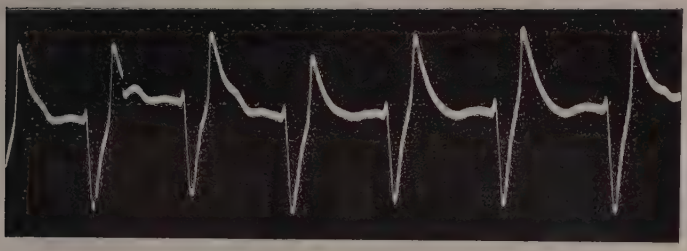


Fig. 26 DII

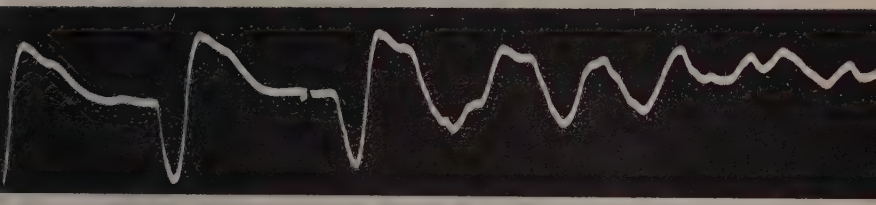


Fig. 27 DII

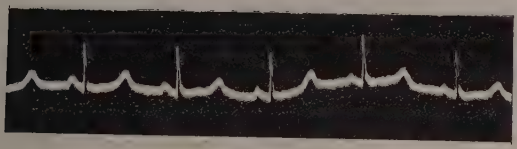


Fig. 27 DII

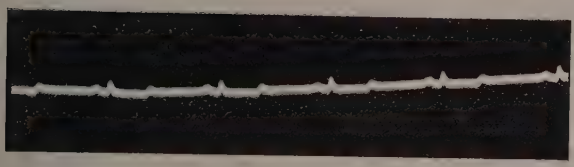


Fig. 29 DII

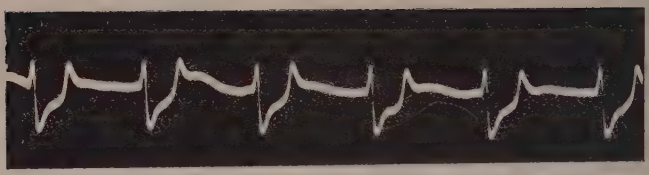


Fig. 30 DII

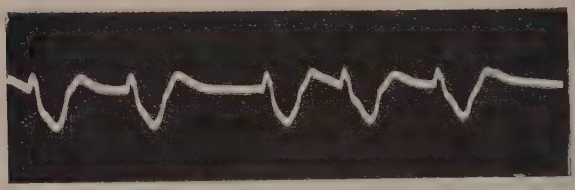


Fig. 31 DII

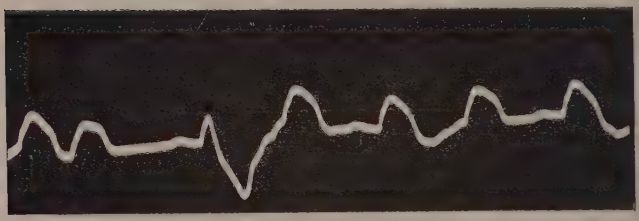


Fig. 32 DII

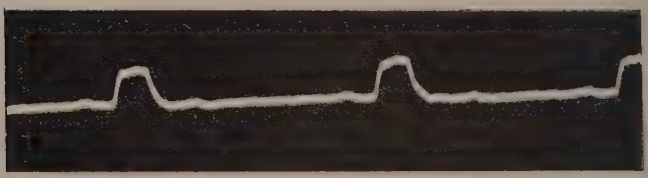


Fig. 33 DII

Modifications de la coagulation sanguine dans la fièvre jaune.

Par les Drs. J. VELLARD et MIGUELOTE VIANNA.

(Note préliminaire)

La diminution de la coagulabilité sanguine dans la fièvre jaune a été souvent signalée, sans que son origine et son mécanisme aient été bien établis. Etant donné le rôle important du foie comme régulateur de la coagulation, et les lésions profondes de cet organe au cours de la fièvre jaune, nous avons jugé intéressant d'aborder l'étude de la coagulation sanguine dans cette affection.

Grâce à la très grande amabilité du Dr. CARLOS CHAGAS, directeur de l'Institut Oswaldo Cruz, et des Drs. EVANDRO CHAGAS et ALVARO LOBO, médecins de l'hôpital de cet Institut, auxquels nous sommes particulièrement heureux d'exprimer ici nos sincères remerciements, nous avons pu examiner une quarantaine de malades de fièvre jaune, atteints de formes diverses, et à différentes périodes de la maladie. Ce sont les résultats de ces premières recherches que nous allons exposer.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

La coagulation sanguine présente au cours de nombreux états pathologiques des altérations profondes, pouvant se ramener à trois types principaux: augmentation ou diminution de l'agent coagulant du sang, la thrombine; variations de l'élément coagulable du plasma, le fibrinogène ; enfin, apparition dans le sang circulant de diverses substances, pouvant exalter ou diminuer l'action des deux éléments précédents; parmi ces substances, les antithrombines, bien étudiées par DOYON, jouent un rôle des plus importants dans l'équilibre du milieu sanguin, dont elles concourent à maintenir la fluidité.

Ces trois facteurs varient indépendamment les uns des autres dans un même organisme, sous l'influence de divers états physiologiques, et, de leurs variations respectives dépend l'ensemble de la coagulation sanguine. C'est ainsi que l'un de nous (J. VELLARD) a vérifié avec V. BRAZIL que dans la fièvre typhoïde, la quantité de thrombine du serum est notablement augmentée, tandis qu'elle diminue dans la syphilis ou chez certains cancéreux. La diminution du fibrinogène a été signalée à la suite de diverses lésions graves de la cellule hépatique, dans certaines intoxications ou après l'ablation du foie (DOYON, NOC, etc.). Les antithrombines augmentent pendant la fièvre typhoïde, d'après A. C. MILLS et K. V. KITZMILLER.

Il existe de nombreux procédés pour l'étude de la coagulation sanguine. Les uns, utilisés en clinique, de maniement très simple, consistent simplement à mesurer le temps de saignement, ou la vitesse de coagulation du sang "in vitro", et ne donnent qu'une idée très générale du phénomène.

D'autres techniques, beaucoup plus minutieuses, ont été proposées pour doser les différents éléments admis par les théories actuelles comme agents de la coagulation : fibrinogène, fibrine, thrombines, antithrombines etc.; elles sont trop longues et trop délicates pour être employées dans des recherches en série.

A la suite de leurs études sur les serums et plasmas normaux, V. BRAZIL et J. VELLARD, se basant sur le fait que la thrombine et les antithrombines passent en grande partie dans le serum après la rétraction du caillot, ont montré que, laissant de côté les considérations théoriques, l'étude experimentale de la coagulation peut être réalisée avec une grande précision en déterminant seulement trois facteurs principaux : pouvoir coagulant du serum (dosage de la thrombine), coagulabilité du plasma (dosage du fibrinogène), et dosage des antithrombines. C'est ce procédé que nous avons adopté avec de légères modifications de détail dans ce travail.

TECHNIQUE

L'action coagulante d'un serum est évaluée d'après le volume de ce serum nécessaire pour coaguler en une heure 1 c.c. de plasma étalon de coagulabilité connue.

Inversement, le volume de serum étalon nécessaire pour coaguler 1 c.c. de plasma à étudier donne l'index de coagulabilité de ce plasma.

Enfin la teneur en antithrombines d'un serum ou d'un plasma est indiquée par le retard apporté par celui-ci à la coagulation d'1 c.c. de plasma étalon par le serum étalon.

Dans tous ces dosages, il est indispensable, pour obtenir des résultats concordants, de se placer toujours dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques.

Comme réactifs, nous avons utilisé le serum et le plasma stabilisé d'un seul cheval, réservé uniquement pour ce service, et dont les propriétés sont périodiquement vérifiées ; le serum est obtenu après la rétraction naturelle du caillot à la température ambiante ; le plasma, fluoré à 3 o/oo (1 c.c. de sol de fluorure de soude à 3 o/o + 9 c.c. de sang), est privé, par centrifugation, de tout élément figuré; plasma et serum ont toujours été employés de 3 à 4 heures après leur préparation.

Le serum et le plasma des malades sont préparés de la même façon que le serum et le plasma étalon; toutefois il est important pour obtenir le plasma, de recueillir directement le sang dans une seringue contenant déjà la solution de fluorure, étant donnée la grande coagulabilité du plasma humain normal. Le matériel d'examen ne parvenant au laboratoire que plusieurs heures après avoir été recueilli, nous avons réalisé tous nos dosages avec des serums et plasmas de 24 heures (conservation à la glacière, de + 2° à + 4° dès leur arrivée au laboratoire) afin d'uniformiser les conditions d'expérience ; ce délai n'altère pas la netteté des réactions.

Les dosages sont faits au bain-marie à 37°; les tubes de réaction, doucement inclinés pour homogéniser leur contenu, ne doivent plus être remués avant la lecture des résultats.

Pouvoir coagulant du serum : Dans une série de cinq petits tubes (du type de ceux d'hémolyse), on place les doses suivantes du serum à étudier: 0,6 c.c.—0,8 c.c.—1 c c.—1,2 c.c.—1,5 c.c ; le volume de chaque tube est complété à 1,5 c.c. avec une solution physiologique de NaC à 8 o/oo, puis chacun d'eux reçoit 1 cc. de plasma étalon; homogénisation du liquide ; lecture après une heure de bain marie à 37°.

Coagulabilité du plasma: Dans une série de cinq tubes on met les doses suivantes de serum étalon: 0,1 c.c.—0,2 c.c.—0,3 c.c.—0,4 c.c.—0,5 c.c.; on complète à 1 c.c. avec la solution physiologique, puis on ajoute à chaque tube 1 c.c. du plasma à étudier ; homogénisation ; bain-marie 37° ; lecture après 1 heure.

Dosage des antithrombines : Les antithrombines peuvent être dosées dans le plasma fluoré ou dans le serum, mais ce dernier doit être inactivé a 56o pendant 30 minutes; les antithrombines étant plus abondantes dans le plasma, nous ne tiendrons compte que des résultats obtenus avec celui-ci. La technique dans les deux cas est la même: Deux tubes seulement sont nécessaires; le premier reçoit 0,5 c.c. du plasma à étudier (ou du serum inactivé) +1 c.c. de plasma étalon ; après 15 minutes de contact, on ajoute 0,5 c.c. de serum étalon. Le second tube, servant de témoin, reçoit 1 c.c. de plasma étalon + 0,5 c.c. de serum étalon. Le volume de chaque tube est complété à 2,5 c.c. avec la solution physiologique; homogénisation; les deux tubes sont portés en même temps au bain-marie à 37o; lecture comparée des deux tubes, de 15 en 15 minutes, pendant une heure.

Pour transcrire les résultats, nous avons adopté le notation suivante :

\+ Commencement de coagulation, caractérisé par l'apparition d'un léger flocon de fibrine.

\+ + Coagulation partielle; caillot mou, se fragmentant.

\+ + + Coagulation subtotale; caillot ferme, glissant le long des parois sans se fragmenter.

\+ + + + Coagulation totale ; caillot ferme, ne se détachant pas du fond du tube.

— Absence de coagulation.

I

ETUDE DE LA COAGULATION CHEZ LES MALADES DE FIÈVRE JAUNE.

Les malades que nous avons étudiés rentrent dans les catégories suivantes:

a) formes mortelles: 10

b) formes graves: 11

c) formes bénignes : 4

d) convalescents: 10 de formes graves et 2 de formes bénignes.

e) cas suspects, non confirmés: 7.

Chez 6 malades seulement, les dosages ont pu être répétés plusieurs fois au cours de la maladie et de la convalescence; tous les autres n'ont été examinés qu'une seule fois. Ces dosages ont été réalisés à diverses périodes de la maladie, du 2ème au 10ème jour, et de la convalescence, entre le 10ème et le 20ème jour après le début de l'affection.

L'âge des malades variait en général de 19 à 50 ans; quatre seulement étaient plus jeunes (14, 15, 16 et 17 ans). Dix appartenaient au sexe féminin et 34 au sexe masculin. Dans de nombreuses observations antérieures, nous avons pu vérifier l'influence sensible de l'âge ou du sexe sur la coagulation; la question des races n'a pas été étudiée.

Pouvoir coagulant du Serum. L'examen du pouvoir coagulant du serum ne révèle aucune modification caractéristique dans la fièvre jaune; les variations observées dans une quinzaine de dosages sont très irrégulières, ne gardant aucune relation directe avec les variations des antithrombines et sont du même ordre que celles qui se rencontrent chez les sujets normaux (Tableau 1); dans l'observation 8, par exemple, le serum est très coagulant, tandis que le plasma est très peu coagulable. Au cours de la

convalescence, le pouvoir coagulant du serum varie peu, tandis que les antithrombines disparaissent.

Cette stabilité du pouvoir coagulant, malgré la présence de quantités élevées d'antithrombines dans la circulation à la phase aigüe de la maladie, laisse supposer que la thrombine subit une certaine augmentation pendant cette période ; la difficulté de séparer la thrombine des antithrombines ainsi que les grandes variations du pouvoir coagulant chez l'homme normal, ne nous ont pas permis de vérifier cette hypothèse. Il s'agit peut-être d'une réaction compensatrice analogue à celle qui s'observe dans la fièvre typhoïde, dans laquelle V. BRAZIL, J. VELLARD et B. RIBEIRO ont noté une élévation notable du pouvoir coagulant, tandis que MILLS et KITZMILLER ont trouvé une augmentation des antithrombines.

Coagulabilité du Plasma. Au contraire, la coagulabilité du plasma présente dans la fièvre jaune des variations constantes et très caractéristiques.

De nombreuses recherches antérieures nous ont montré que le plasma humain normal présente toujours un degré de coagulation plus ou moins avancé avec 0,1 c.c. de notre serum étalon, dans les conditions expérimentales que nous avons indiquées (1 heure bain-marie 37o); des résultats identiques ont été obtenus au cours de diverses affections : paludisme, verminose, pemphigus, syphilis, lèpre, tumeurs etc.; parfois même, la coagulabilité est augmentée, par exemple dans la grossesse.

Chez tous les malades de fièvre jaune que nous avons examinés pendant la phase aigüe de la maladie, au nombre de 25, le plasma présentait sans aucune exception, quelle que soit la forme observée, une diminution accentuée de la coagulabilité; tandis que chez 7 individus, envoyés à l'hôpital comme suspects, et dont, par la suite, le diagnostic de fièvre jaune ne fut pas confirmé cliniquement, le plasma coagulait normalemeut avec 0,1 c.c. de serum étalon.

Cette diminution de la coagulabilité est précoce; elle était déjà notable (++ avec 0,2 c.c. de serum etalon) à la fin du 2ème jour, chez un sujet atteint d'ailleurs d'une forme très bénigne, non hémorrhagique (Obs. 34); le troisième jour, elle était considérable dans deux formes mortelles (Obs. 23 et 24). Elle diminue encore les jours suivants pour atteindre dans les formes moyennes ou graves son chiffre le plus bas, entre le 7ème et le 9ème jour. Pendant la convalescence, la coagulabilité se relève plus ou moins rapidement, suivant la gravité de l'affection: elle était presque revenue au taux normal, au 11ème jour de la maladie, dans une forme cardiaque moyenne, non hémorrhagique (Obs. 1); au contraire, 20 jours après le début de la maladie et 5 après celui de la convalescence, la coagulabilité était encore très diminuée dans une forme hémorrhagique très grave (Obs. 28).

Dans les formes bénignes, la diminution de la coagulabilité est aussi précoce, mais beaucoup moins accentuée et le retour à la normale plus rapide (0,1++ au 9ème jour de la maladie dans l'Obs. 2). Dans les formes mortelles, la coagulabilité s'abaisse souvent plus rapidement que dans les autres formes, sans que ceci soit un fait constant (Graphique 1); dans l'observation 35, par exemple, (forme acholique), le plasma présentait, au 8ème jour de la maladie, un degré de coagulabilité supérieur à celui observé dans plusieurs formes non mortelles à la même période. La dissociation relative entre l'indice de coagulabilité et la gravité de la maladie s'observe surtout dans les formes cérébrales (Obs. 32) et cardiaques (Obs. 5), où les phénomènes hémorrhagiques sont également moins accentués que dans les autres formes.

La diminution de la coagulalibité est au contraire beaucoup plus accentuée dans les formes hémorrhagiques, dans lesquelles seulement s'observent des plasmas complétement incoagulables par le serum étalon ; dans quelques cas même, le sang restait fluide "in vitro" pendant plusieurs jours, sans addition de substances anti-coagulantes (Obs. 11, 20, 38). Nous avons toujours trouvé une relation étroite entre les altérations de la coagulabilité et l'importance des hémorrhagies.

Le graphique I, ainsi que les tableaux II, III et IV résument toutes nos observations pendant la phase aigüe de la maladie chez des individus atteints de formes mortelles (II), graves (III) et bénignes (IV). Dans le tableau V sont réunis les malades isolés comme suspects de fièvre jaune, et reconnus plus tard atteints d'affections fébriles différentes, broncho-pneumonie, grippe et paludisme ; chez tous ceux-ci, l'indice de coagulabilité était normal. Les tableaux VI et VII se rapportent aux convalescents; à peu d'exceptions près, le plasma était revenu à la normale le 20ème jour après le début de la maladie.

Antithrombines. Les altérations de la coagulabilité du plasma peuvent avoir une double origine: la diminution, ou même la disparition presque totale du fibrinogène, ou l'apparition d'une grande quantité d'antithrombines dans la circulation.

La diminution du fibrinogène a été signalée par différents auteurs à la suite de lésions profondes de la cellule hépatique (intoxications par le chloroforme, l'arsenic, le phosphore), après l'extirpation du foie (chien grenouille, poissons), ou à la suite de l'oblitération expérimentale des artères de cet organe. Certains venins, tels que ceux des *Lachesis* sud-américaines, doués d'une action protéolytique intense, altérent complètement toutes les substances protéiques du plasma et rendent ainsi le sang incoagulable.

D'autres substances déterminent la diminution de la coagulabilité sanguine en provoquant dans l'organisme la formation d'antithrombines; ainsi après l'injection de peptone, de certains serums, de morphine, le sang devient incoagulable sans qu'il y ait altération du fibrinogène. On admet généralement que les antithrombines se forment dans le foie; la bile ou les sels biliaires, très peu actifs in vitro, rendent rapidement le sang incoagulable par injection endo-veineuse. Dans différents états pathologiques (fièvre typhoide, hémophilie, états anaphylactiques, etc.), l'apparition d'antithrombines a également été signalée.

Nos premières recherches ont visé à vérifier la présence d'antithrombines dans le plasma des malades, à l'aide de la technique décrite un peu plus haut.

La coagulation normale du plasma étalon par le serum étalon employés dans ces expériences dans les conditions indiquées (1 c.c. de plasma + 0,5 c.c. de serum, le volume étant complété à 2,5 c.c. avec une solution physiologique) est déjà avancée après 15 minutes de bain-marie, et totale en 30 minutes. Le plasma humain normal est d'ordinaire dépourvu d'antithrombines et active la coagulation au lieu de la retarder; mais dans différents états pathologiques, broncho-pneumonie, typhoïde, malaria, etc., les antithrombines apparaissent, généralement dans des proportions assez faibles, et déterminent un léger retard de la coagulation du plasma étalon par le serum étalon.

Dans presque tous les cas de fièvre jaune, graves ou mortels, examinés pendant la première décade, au nombre de 18, le plasma occasionnait un retard marqué de la coagulation dans les tubes de réaction, la coagulation totale ne se produisant que plus de 30 minutes après celle des témoins; trois plasmas seulement ont fait exception (Obs. 5, 32, 4). Quelques plasmas, dont la coagulabilité était très diminuée (Obs. 31, 20), ou même

nulle (Obs. 38), empêchaient même pendant 24 heures toute trace de coagulation.

Dans les formes bénignes, où la coagulabilité du plasma était moins modifiée, les antithrombines étaient également moins abondantes, ne déterminant qu'un retard léger (Obs. 21), quelquefois très peu marqué (Obs. 34) dans la coagulation des tubes de réaction.

Les antithrombines existent dès le second jour de la maladie; elles atteignent leur maximum entre le 7ème et le 9ème jour, quand la diminution de la coagulabilité est également plus marquée, mais elles sont souvent assez longues à disparaître totalement; chez plusieurs convalescents, l'action inhibitoire du plasma était encore notable quand la coagulabilité était déjà redevenue normale (Obs. 11, 13).

La comparaison de la courbe des antithrombines avec celle de la coagulabilité du plasma (graphiques II et III) montre ainsi dans l'ensemble des relations étroites entre ces deux phénomènes sans que l'on puisse toutefois établir entre eux un parallèlisme absolu. La diminution de la coagulabilité est quelquefois plus forte que ne permettrait de le supposer le dosage des antithrombines (Obs. 23, 30, 4); dans certains cas, ces dernières étaient même très peu abondantes (Obs. 5, 32).

A côté du facteur principal, représenté par les antithrombines, interviennent probablement, dans certaines formes particulièrement graves des altérations ou une diminution du fibrinogène. Mais, même dans ces formes où le sang devient spontanément incoagulable, surtout à la période agonique, ces altérations du fibrinogène ne sont jamais très accusées. En employant comme réactif le venin de *Lachesis jararaca*, nous avons toujours obtenu la coagulation totale du plasma; tout au plus observait-on, avec des plasmas très riches en antithrombines et de faibles doses de venin (0,001mg.), un certain retard sur les témoins (Obs. 38), retard disparaissant en augmentant la dose de venin ; le caillot observé était toujours parfaitement normal (Tableau VIII).

Enfin, la présence, dans le plasma des malades de fièvre jaune, de nombreux pigments biliaires, dont le rôle anti-coagulant "in vivo" est connu, peut renforcer l'action des antithrombines.

II

RECHERCHES EXPERIMENTALES CHEZ LE MACACUS RHESUS.

Le Dr. H. ARAGÃO, qui poursuit des recherches extrêmement intéressantes sur la fièvre jaune expérimentale, a eu la très grande complaisance, dont nous sommes heureux de pouvoir le remercier ici, de nous confier du sang de *Macacus rhesus* inoculés avec du virus de fièvre jaune, afin de comparer les modifications de la coagulation chez l'homme et chez le singe.

La coagulabilité normale du plasma de Rhesus est peu différente de celle du plasma humain (entre 0,05 et 0,15); les antithrombines y font entièrement défaut.

Rhesus 371, inoculé avec 0,5 c.c. de sang d'un autre Rhesus; le sang recueilli le 4ème jour après l'inoculation, dans la période d'hypothermie finale,

peu avant la mort, montrait une grande diminution de la coagulabilité (0,3—; 0,4 + +); et une forte proportion d'antithrombines (retard de 45 minutes dans le début de la coagulation).

Rhesus 373, inoculé avec 0,5 c.c. de sang du précédent; le plasma ne présentait pas de modifications nettes de la coagulabilité (0,2 + +), et était depourvu d'antithrombines le 3ème jour après l'inoculation, au premier jour de fièvre (mort en 5 jours).

Deux autres Rhesus, chez qui l'affection évolua lentement (mort le 13ème jour), l'un inoculé avec du sang virulent d'un autre Rhesus (369), l'autre piqué par des moustiques infectés (370), ne montrèrent le 5ème et le 6ème jour après l'inoculation, au moment d'une première élévation de température, ni modifications de la coagulabilité, ni présence d'antithrombines.

Nous continuons actuellement cette étude. Ces premiers résultats ne permettent de tirer aucune conclusion; il semble cependant que les modifications de la coagulation sanguine chez le Rhesus sont de même nature que celle observées chez l'homme, mais apparaissent plus tardivement et sont moins accusées.

CONSIDÉRATIONS FINALES.

Les altérations de la coagulation sanguine, observées dans la fièvre jaune, paraissent dépendre exclusivement des lésions hépatiques, dont elles indiquent la gravité. Elles n'ont rien de spécifique, mais leur constance dès le début de la maladie et dans toutes les formes, même dans des cas légers, peut leur donner une certaine importance pour le diagnostic de cette affection. L'action inhibitoire du plasma n'a par elle-même que peu de valeur, à moins d'être très accusée, puisqu'elle peut se retrouver dans des affections très diverses: tumeurs, lèpre, grippe, broncho-pneumonie, paludisme, etc. Au contraire, la diminution de la coagulabilité du plasma, toujours très accentuée dans la fièvre jaune, n'a pas encore été signalée dans d'autres affections fébriles et nous a toujours permis de confirmer le diagnostic dans les cas douteux (Obs. 7, 10, 16, 35 notamment). Il serait important de rechercher cette réaction dans d'autres affections hépatiques, et surtout dans les ictères graves ; chez un malade atteint de carcinome du foie, et chez un autre atteint de carcinome de la tête du pancréas avec ictère très accusé, l'un de nous (J. VELLARD) a déjà eu l'occasion de vérifier une grande diminution du pouvoir coagulant du serum et l'apparition de petites quantités d'antithrombines, sans diminution sensible de la coagulabilité du plasma.

Telle qu'elle est actuellement, cette réaction nous paraît pouvoir être de quelque utilité dans le diagnostic précoce de la fièvre jaune.

L'importance des altérations de la coagulation sanguine ne doit pas être négligeable dans l'origine des hémorrhagies si fréquentes au cours de cette affection, et que de nombreux auteurs attribuent exclusivement à des lésions des parois des petits vaisseaux, surtout des capillaires, dues à la dégénérescence graisseuse de leurs parois ou même à la diapédèse. Les hémorrhagies très abondantes coïncident toujours avec un très grand abaissement de la coagulabilité.

En ce qui concerne l'évolution de la maladie, une diminution précoce et très accentuée de la coagulabilité assombrit beaucoup le pronostic.

SOMMAIRE.

L'étude des modifications de la coagulation sanguine à l'aide de la technique BRAZIL-VELLARD, réalisée chez 25 malades atteints de formes diverses, mortelles, graves, et bénignes, entre le IIème et le XIIIème jour de maladie, et chez 12 convalescents, a permis d'arriver aux conclusions suivantes:

1º. Les variations du pouvoir coagulant du serum sont très irrégulières et peu différentes de celles observées chez de sujets normaux.

2º. La coagulabilité du plasma, dès le IIème jour de la maladie, présente une diminution marquée, constante chez tous les malades, atteignant son chiffre le plus bas entre le VIIème et le IXème jour et revenant progressivement à la normale pendant la convalescence.

3º. Cette diminution de la coagulabilité est due principalement à l'apparition de grandes quantités d'antithrombines dans la circulation ; la diminution du fibrinogène observée dans quelques cas, est toujours peu accusée.

4º. La diminution de la coagulabilité du plasma, qui n'a jusqu'ici été observée avec cette intensité que dans la fièvre jaune, peut être d'un certain secours pour le diagnostic précoce de cette affection; elle n'a jamais été vérifiée chez des malades atteints d'autres affections fébriles.

5º. Au point de vue du pronostic, la diminution précoce et très accentuée de la coagulabilité est un symptôme grave, indiquant une lésion profonde de la cellule hépatique.

6º. Dans la fièvre jaune expérimentale du *Macacus rhesus*, les altérations de la coagulation sanguine sont de même nature, mais paraissent plus tardives et moins accusées que chez l'homme.

Travail de l'Institut Vital Brazil.
Niteroi, Etat Rio de Janeiro.

TABLEAU I. Pouvoir coagulant du serum.

No. des malades	Sexe	Âge	Jours de maladie	Pouvoir * coagulant du serum 60'	Pouvoir anti-coagulant du serum (0,5) c.c. 60'	Coagulabilité * du plasma 60'	Observations
8 I. D.	masc.	14a	IV	0,6 c.c. + +		0,4 c.c. +	HH. gg.
7 A. P.	masc.	22a.	IV	1 c.c. + +		0,1 c.c. + +	Broncho pneumonie
30 D. E.	masc.	17a.	IV	1,2 c.c. –	Nul		h. g.
2 S. I.	masc.	20a.	V	1 c.c. +	Nul	0,2 c.c. + + +	Ho.
4 M. C.	fem.	15a.	VI	1,2 c.c. —	++++(R 30')	0,3 c.c. +	H. † VII jour.
9 F. C.	masc.	19a.	VII	1 c.c. +		0,4 c.c. +	H. † VIII jour.
1 M. M.	masc.	28a.	VII	1,2 c.c. —	+ + +	0,3 c.c. +	Ho.
2 S. I.	masc.	20a.	IX	1 c.c. +	Nul	0,1 c.c. + +	C. le VIII jour.
1 M. M.	masc.	28a.	XI	1,2 c.c. —	Nul	0,1 c.c. + + +	C. le IX jour.
33 G. P.	masc.	24a.	XII	1,2 c.c. +	Nul	0,1 c c. + +	H. C. le XI jour.
3 A. A.	masc.	19a.	XIII	1,2 c.c. —	Nul	0,2 c.c. + + +	h.
3 A. A.	masc.	19a.	XX	1,2 c.c. –	Nul	0,1 c.c. +	h. C. le XIV jour.

* Les chiffres indiquent le premier tube où la coagulation a été observée.

Abréviations: HH. grandes hémorrhagies — H. hémorrhagies discrètes; vomito negro peu abondant — h. hémorrhagies très peu marquées, limitées âux gencives et à la muqueuse nasale — Ho. absence d'hémorrhagies — g. forme grave — gg. forme très grave — C. début de la convalescence — † mort — R. retard de la coagulation.

TABLEAU II. Modifications du plasma dans les formes mortelles.

No. des malades	Sexe	Âge	Jours de maladie	Coagulabilité du plasma 60'	Pouvoir anti-coagulant du plasma (0,5) c.c. 60'	Observations
23 A. A.	fem.	20a.	III	0,4 c.c. ±	+ + +	H. † du Vème au VIe jour.
24 A. A.	masc.	51a.	III	0,3 c.c. + + +	± + +	H. † du Vème au VIe jour
22 A. R.	masc.	25a.	IV	0,4 c.c. + +	+	HH. † le VIIe jour.
5 J. J.	masc.	31a.	IV	0,2 c.c. +	Nul	h. † le VIIIème jour.
31 J. A.	masc.	40a.	V	0,4 c.c. −	− − − −	HH. † le VIe jour.
38 E. O.	masc.		V	0,5 c.c. −	− − − −	HH. † le Ve jour.
32 A. S.	masc.	19a.	V	0,3 c.c. + + +	+ + + + (R. 15')	H. forme cérébrale † le VI jour.
4 M. C.	fem.	15a.	VI	0,3 c.c. +	+ + + + (R. 30')	H. † le VIIe jour.
9 F. C.	masc.	19a.	VII	0,4 c.c. ±		H. † le VIIIe jour.
35 M. A.	masc.		VIII	0,3 c.c. + +	+ +	H. † le IXe jour.

TABLEAU III. Modifications du Plasma dans les formes graves.

No. des malades	Sexe	Âge	Jours de maladie	Coagulabilité du plasma a 60'	Pouvoir anti-coagulant du plasma (0,5) c.c. 60'	Observations
16 E. M.	masc.	20a.	IV	0,2 c.c. +	+ + +	Ho.
8 I D.	masc.	14a.	IV	0,4 c.c. +		HH. gg.
30 A. R.	fem.	30a.	V	0,3 c.c. + + +	+ + +	H.
29 C. F.	masc.	34a.	V	0,2 c.c. + +	+ + +	h.
14 D. M.	masc.	38a.	VI	0,3 c.c. +	+ + ±	H.
1 M. M.	masc.	28a.	VII	0,3 c.c. +		Ho.
11 A. M.	masc.	42a.	VIII	0,4 c.c. −	+	HH. gg.
20 A. P.	masc.	24a.	IX	0,4 c.c. −	− − − −	H. gg.
18 J. C.	masc.	25a.	IX	0,5 c.c. +	+ +	Ho.
17 R. L.	masc.	23a.	IX	0,3 c.c. + +	+ +	HH. gg.
3 A. A.	masc.	19a.	XIII	0,2 c.c. + + +	+ + +	h.

TABLEAU IV. Modifications du Plasma dans les formes bénignes.

N°. des malades	Sexe	Âge	Jours de maladie	Coagulabilité du plasma 60'	Pouvoir anti-coagulant du plasma (0,5) c.c. 60'	Observations
34 P. X.	masc.	34a.	II	0,2 c.c. + +	+ + + + (R. 15')	Ho.
2 S. I.	masc.	20a.	V	0,2 c.c. + + +		Ho.
19 E. C.	fem.	29a.	VII	0,2 c.c. + +		h.
21 A. S.	fem.	31a.	VIII	0,3 c.c. + + +	+ + +	Ho.

TABLEAU V. Cas suspects, non confirmés.

N°. de malades	Sexe	Age	Jours de maladie	Coagulabilité du plasma 60'	Pouvoir anti-coagulant du plasma (0,5) c.c. 60'	Observations
6 A. M.	masc.	33a.		0,1 c.c. + +		Grippe.
7 A. P.	masc.	22a.	IV	0,1 c.c. + +		Broncho-pneumonie.
10 M. R.	fem.	42a.		0,1 c.c. +	+ + + + (R. 15')	Malaria (tierce bénigne).
12 S. L.	masc.	22a.	24 heures	0,1 c.c. + +	+ + + + (R. 15')	Grippe.
15 M. C.	fem.	29a.	24 heures	0,1 c.c. +	+ + + +	Grippe.
36 A. B.	masc.		48 heures	0,1 c.c. + + +	+ + +	Grippe.
37 M. P.	masc.	47a.	IV	0,1 c.c. +	+ + + + (R. 15')	Broncho-pneumonie.

TABLEAU VI. Modifications du plasma chez les convalescents de fièvre jaune.

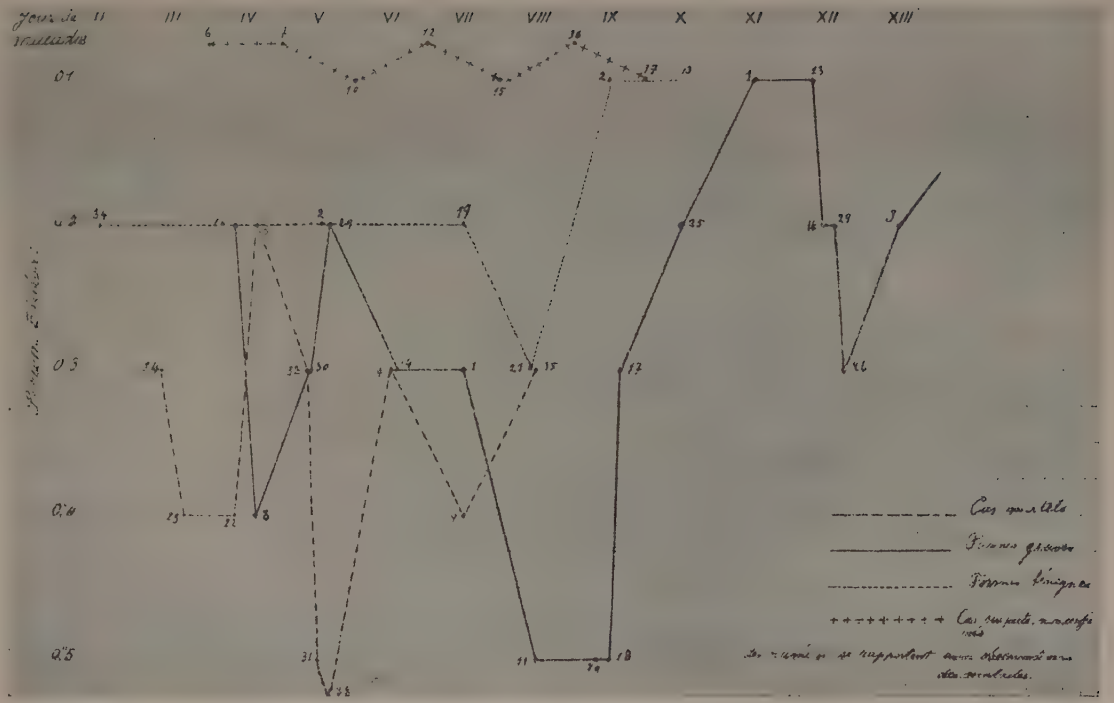
N°. des malades	Sexe	Age	Jours de maladie	Coagulabilité du plasma 60'	Pouvoir anti-coagulant du plasma (0,5) c.c. 60'	Observations
Formes graves						
25 M. J.	fem.	16a.	X	0,2 c.c. + + +	+ + + + (R. 30')	H. C. le IXème jour.
1 M. M.	masc.	28a.	XI	0,1 c.c. + + +		Ho. C. le IXème jour.
26 G. A.	fem.	17a.	XII	0,3 c.c. + +	+ + +	H. C. le XIIème jour.
14 D. M.	masc.	45a.	XII	0,2 c.c. +	+ + + + (R. 30')	H. C. le XIIème jour.
33 G. P.	masc.	24a.	XII	0,1 c.c. + +		H. C. le XIème jour.
29 C. F.	masc.	34a.	XII	0,2 c.c. + + + +	+ + +	h. C. le IXème jour.
11 A. M.	masc.	42a.	XIV	0,2 c.c. + +	+	HH. gg. C. le XIVème jour.
27 A. S.	masc.	26a.	XVII	0,2 c.c. + + +	+ + +	H. C. le Xème jour.
28 M. F.	fem.	18a.	XX	0,2 c.c. + +	+ + +	H. gg. C. le XVème jour.
3 A. A.	masc.	19a.	XX	0,1 c.c. +	+ + + + (R. 15')	h. C. le XIVème jour.
Formes bénignes						
2 S. I.	masc.	20a.	IX	0,1 c.c. + +		Ho. C. le VIIIème jour.
13 R. H.	masc.	38a.	X	0,1 c.c. + +	+ + +	Ho. C. le Xème jour.

TABLEAU VII. Modifications du plasma à différentes périodes de la maladie, chez les mêmes sujets.

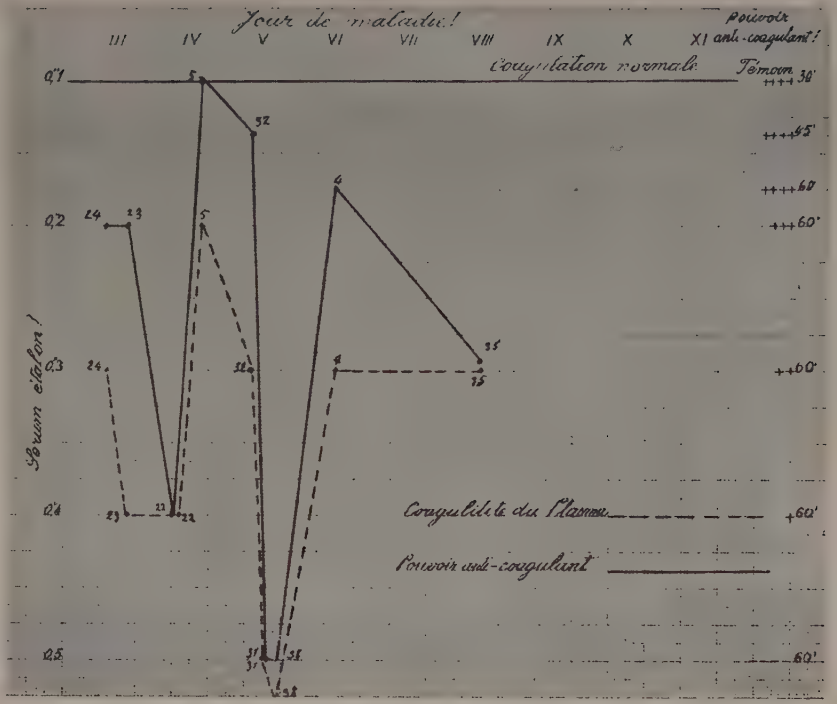
No. des malades	Sexe	Age	Jours de maladie	Coagulabilité du plasma 69'	Pouvoir anti-coagulant du plasma (0,5) c.c. 60'	Observations
Formes graves						
1 M. M.	masc.	28a.	VII	0,3 c.c. +		Ho.
1 M. M.	masc.	28a.	XI	0,1 c.c. + + +		C. le IXème jour.
3 A. A.	masc.	19a.	XIII	0.2 c.c. + + +	+ + +	h.
3 A. A.	masc.	19a.	XX	0,1 c.c. +	+ + + + (R. 15')	C. le XIVème jour.
11 A. M.	masc.	42a.	VIII	0,4 c.c. —	+	HH. gg.
11 A. M.	masc.	42a.	XIV	0,2 c.c. + +	+	C. le XIVème jour.
14 D. M.	masc.	38a.	VI	0,3 c.c. +	+ + +	Ho.
14 D. M.	masc.	38a.	XII	0,2 c.c. +	+ + + + (R. 30')	C. le XIIème jour.
29 C. F.	masc.	34a.	V	0,2 c.c. + +	+ + +	h.
29 C. F.	masc.	34a.	XII	0,2 c.c. + + + +	+ + +	C. le IXème jour.
Formes bénignes						
2 S. I.	masc.	20a.	V	0,2 c.c. + + +		Ho.
2 S. I.	masc.	20a.	IX	0,1 c.c. + +		C. le VIIIème jour.

TABLEAU VIII. Coagulabilité du plasma des malades de fièvre jaune par le Venin de *Lachesis jararaca*.

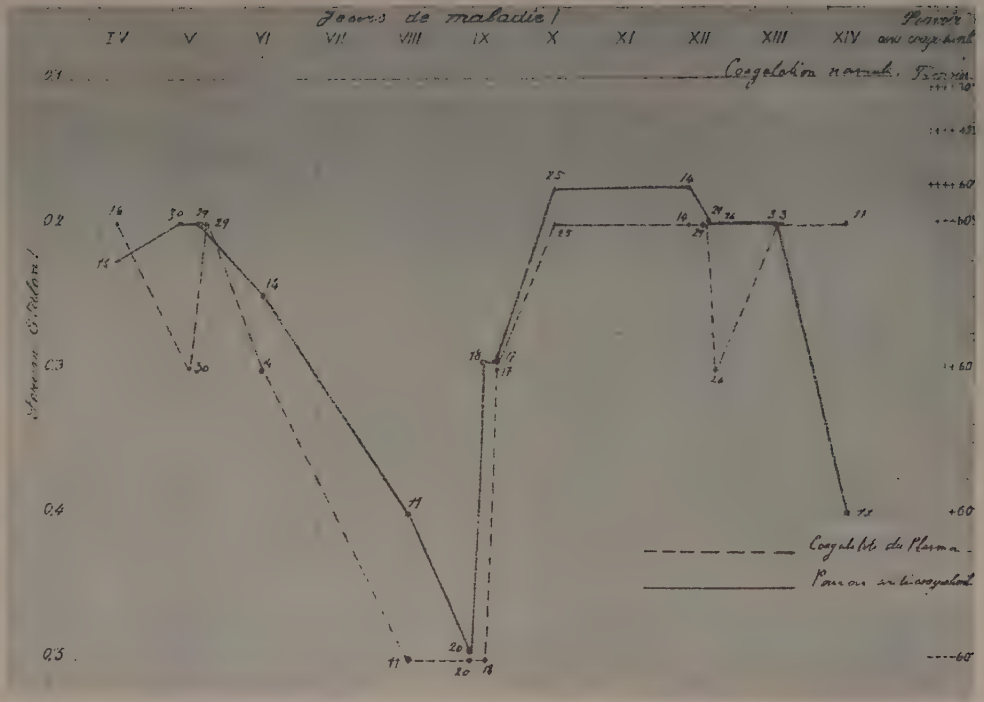
No. des malades	Doses de Venin de L. jararaca en mmg.	COAGULABILITÉ PAR LE VENIN DE L. JARARACA : Lecture 15'	Lecture 30'	Lecture 45'	Lecture 60'	Coagulabilité par le Serum Etalon [0,5] c.c. 60'	Observations
Témoin:							
1 c.c. Plasma Etalon	0,001	—	+ + + +	+ + + +	+ + + +		
Témoin :							
1 c.c. Plasma Etalon	0,2	++++ (2')	+ + + +	+ + + +	+ + + +		
34 P. X.	0,001	—	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0,2 c.c. + +	Forme bénigne IIème jour
35 M. A.	0,001	—	—	+ +	+ + + +	0,3 c.c. + +	† IXème jour. H.
36 A. B.	0,001	—	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0,1 c.c. +++	Grippe
37 M. P.	0,001	—	+ + + +	+ + + +	+ + + +	0,1 c.c. +	Broncho-pneumonie
38 E. O.	0,001	—	—	+ +	+ + +	0,5 c.c. —	† le Vème jour HH.
38 E. O.	0,02	++++ (5')				0,5 c.c. —	† le Vème jour HH.



Graphique 1 : *Coagulabilité du Plasma dans la fièvre jaune.*



Graphique II : *Courbes comparées de la coagulabilité et du Pouvoir anti-coagulant du Plasma dans les formes mortelles.*



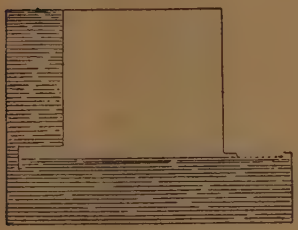
Graphique III : *Courbes comparées de la coagulabilité et du Pouvoir anti-coagulant du Plasma dans les formes graves.*

Communicação apresentada á Sociedade Brasileira de Biologia (Sessão de 24-IV-929)

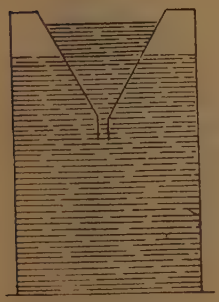
Pelos Drs. ALCIDES GODOY e N. BOTAFOGO GONÇALVES.

Na prophylaxia da febre amarella temos que combater o mosquito transmissor recorrendo a todos os meios para destruil-o, impedindo-lhe a procriação pela eliminação das aguas retidas que favorecem a desova, protegendo os reservatorios afim de impedir-lhe o accesso, e destruindo as larvas, nymphas e insectos adultos pelo emprego de insecticidas; isso porém nem sempre é de facil execução, algumas collecções d'agua permanecendo escondidas, difficeis de serem encontradas, permittindo aos mosquitos livre multiplicação.

Schema A.



Pensou-se então collocar nos logares preferidos pelos culicideos vasilhas onde suas femeas viessem depositar os ovos, desviando-as assim de outros pontos inobservados, e destruindo-se-os antes da sua eclosão; tambem para o "controle" da efficacia de prophylaxia são estas armadilhas empregadas; requerem, porém, sevéra vigilancia para não produzirem effeito contrario ao desejado.



Schema B

Os apparelhos representados nos schemas A e B, os quaes pódem ser construidos de differentes maneiras baseadas no mesmo principio, são armadilhas de absoluta segurança, não sendo possivel ás larvas darem sahida ao insecto adulto em condições de liberdade.

Esses apparelhos compõm-se, resumidamente, de tres partes, sendo a primeira uma superficie com agua destinada á desova das femeas de mosquito, no schema A isolada por uma rêde ou qualquer outro obstaculo que impeça a volta das larvas desenvolvidas á superficie aberta para o exterior, e no schema B podendo ser inteiramente livre; a segunda parte é reservada ao desenvolvimento das larvas e ao aprisionamento dos insectos adultos, sendo a terceira, facultativa, um reservatorio de nivel constante.

Não sómente com fins prophylacticos pódem ser esses apparelhos empregados, mas tambem para estudos da biologia do mosquito, podendo ser collocados em pontos afastados dos laboratorios, prestando-se sobretudo para esse fim o representado pelo schema A, provido de reservatorio d'agua mantendo o nivel constante.

Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados [1]

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA.

Logo que surgiram os primeiros casos de febre amarella no Rio de Janeiro, occorreu-nos a ideia de averiguar qual o modo de contaminação dos individuos sujeitos ás picadas de mosquitos infectados, se exclusivamente pela saliva desses mosquitos, emittida no acto da picada, se pelas gotticulas do liquido, que sempre expellem pelo anus, quando se engorgitam de sangue.

Depois de algumas experiencias preliminares, que nos orientaram sobre a melhor technica a seguir, fizemos as que aqui descreveremos detalhadamente, pelas quaes fomos levados a concluir que as dejecções de mosquitos infectados, inoculadas por via subcutanea, são sufficientes para infectar o *Macacus rhesus*.

Os mosquitos que empregámos nas nossas experiencias (*Aëdes* (*Stegomyia) aegypti)*, obtidos de criações feitas no laboratorio, eram retirados das gaiolas communs e transportados para gaiolas de vidro de GODOY (Fig. 1).

Para infectal-os applicavamos estas gaiolas sobre a pelle de um macaco inoculado com o virus da febre amarella no primeiro dia de febre. Mantidos n'essas mesmas gaiolas até se tornarem infectantes, retiravamos, quando pretendiamos realisar qualquer experiencia, os necessarios exemplares, transportando-os para pequenos tubos de vidro (fig. 2) com uma das aberturas fechada com flanella e a outra com um tampão de algodão. A flanella tem a vantagem de ser atravessada com relativa facilidade pela proboscida do mosquito e impedir que qualquer gotticula de excreta a imbeba. Esses tubos, contendo, cada um, sómente um mosquito infectado, ficavam um ou dois dias em camara não muito humida e, para que promptamente picassem por occasião da experiencia, não se lhes dava alimento algum, durante esse tempo. Escolhiamos então dois *rhesus,* um para ser exclusivamente picado pelos mosquitos atravéz da flanella dos tubos e outro para ser inoculado com a diluição das fezes desses mesmos mosquitos. Logo que estes se engorgitavam de sangue no primeiro *rhesus*, afastavamos os tubos da pelle do macaco e os collocavamos horizontalmente sobre um supporte qualquer. Com o abdomen pejado de sangue os mosquitos pouco se movem e em alguns segundos pousam sobre a parede do tubo. A emissão de gotticulas de excreta, que se inicia, ás vezes, quando o insecto ainda está terminando a sucção do sangue, mais se evidencia quando os mosquitos repousam. Expellem então gotticulas que, não raro, formam uma gotta perfeitamente visivel a olho nu e que póde ser facilmente assignalada por uma pinta de tinta marcada na superficie externa

(1) Apresentado á Sociedade Brasileira de Biologia, em sessão de 29 de Maio de 1929.

do tubo. Retiravamos, em seguida, os mosquitos dos tubos, depois de anesthesial-os rapidamente com ether e colhiamos o material a ser inoculado. Para isto, tomavamos uma seringa com um pouco de agua esterilizada e, comprimindo o embolo, deixavamos cahir uma pequena quantidade deste liquido sobre os pontos em que se achavam as dejecções. Com a ponta da agulha faziamos a diluição, aspirando-a novamente para a seringa. A operação era repetida em todos os tubos, de modo a reunir na seringa material das dejecções de todos os mosquitos que haviam sugado o primeiro *rhesus*. Injectavamos então essa diluição, por via subcutanea, no outro *rhesus*, fazendo-se tambem algumas escarificações no tegumento do mesmo e sobre ellas vasando a mesma diluição.

Eis, em resumo, o observado nessas experiencias:

EXPERIENCIA 1—*M. rhesus* nº. 245. Temperatura inicial: 38º,8. Picado a 7 de Janeiro de 1929 por 5 mosquitos que haviam a 17 de Dezembro de 1928 sugado o *rhesus* infectado nº. 226, no periodo febril e, d'essa data em diante, alimentados a mel, como habitualmente fazemos com os mosquitos infectados.

Este macaco não apresentou reacção febril muito accentuada, sendo a maxima 39º,6 observada no 5º dia depois de ser picado. Desse dia em diante a temperatura declinou. No 8º dia apresentou-se á tarde com 37º,2 e cahido na gaiola. Foi, então, sacrificado. A autopsia e o exame histopathologico não revelaram lesão alguma de febre amarella.

EXPERIENCIA 2—*M. rhesus* nº. 246. Temperatura inicial: 38º,5. Inoculado tambem a 7 de Janeiro com diluição das fezes dos mosquitos que picaram o *rhesus* nº. 245.

No 3º dia depois da inoculação apresentou febre de 40º e no 4º dia 40º,1. Deste dia em diante a temperatura baixou, observando-se, entretanto, uma serie de pequenas oscillações. A 22, isto é, 15 dias depois de inoculado, novamente a temperatura ascendeu a 40º,5 oscillando, porem, nos 3 dias seguintes, entre 39º,6 e 39º,4. Finalmente a 26 a temperatura cahio a 36º,2 apresentando-se então o macaco muito enfraquecido.

Sacrificado nesse mesmo dia, verificámos que as visceras apresentavam o aspecto caracteristico observado nos casos de febre amarella. Entretanto, o exame histo-pathologico do figado não demonstrou a presença das lesões typicas da febre amarella.

EXPERIENCIA 3—*M. rhesus* nº. 400. Temperatura inicial: 38º,8. Picado a 30 de Abril por 6 mosquitos que haviam picado a 28 de Março o *rhesus* infectado nº. 369, no primeiro dia de febre.

A 5 de Maio, isto é, 5 dias depois de picado, apresentava, de manhã, 40º. No dia seguinte a temperatura baixou a 39º, para á tarde novamente se elevar a 40º,1. A 7—40º,2 de manhã e á tarde. A 8—38º,8 de manhã. A' tarde a temperatura cahio a 37º,8 sendo então sacrificado. O exame macroscopico das visceras e histo-pathologico do figado demonstraram a presença de lesões typicas da febre amarella.

EXPERIENCIA 4—*M. rhesus* nº. 401. Temperatura inicial: 39º,3. Inoculado a 30 de Abril com excreta dos mosquitos que sugaram o *rhesus* nº. 400.

Dois dias depois da inoculação a temperatura se elevou a 40º. Desse dia em diante oscillou entre 39º,7 e 39º,5.

A 8 foi sacrificado e autopsiado, não obstante apresentar a temperatura de 39º,5. Nessa occasião retirámos sangue do coração e inoculámos no *rhesus* 415, da experiencia seguinte.

As visceras apresentavam aspecto normal e o exame histo-pathologico foi tambem negativo.

EXPERIENCIA 5—*M. rhesus* nº. 415. Temperatura inicial: 38º,8. Inoculado a 8 de Maio, por via intraperitoneal, com sangue retirado do coração do *rhesus* nº. 401.

A 13 apresentava 40º,5, mantendo-se a temperatura elevada, entre 40º,6 e 40º,3 no dia seguinte.

A 15 de manhã, apresentava 38º,5 e ás 19,40 horas, quando foi sacrificado, 36º,8.

Na autopsia notámos lesões macroscopicas typicas da febre amarella, confirmando-se tambem essa verificação pelo exame histo-pathologico do figado, que revelou a presença de inclusões acidophilas nucleares, necrose salpicada das cellulas hepaticas, degeneração e infiltração gordurosas e congestão.

EXPERIENCIA 6—*M. rhesus* nº. 417. Temperatura inicial: 38º,8. Picado a 10 de Maio por 5 mosquitos que sugaram a 1 de Abril o *rhesus* infectado nº. 373, no primeiro dia de febre.

A 15, á tarde, apresentava 39º,9. Nos dias seguintes a temperatura se manteve entre 40º e 40º,5. A 17 foi sangrado e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 422. A 18 a temperatura ascendeu a 40º,8 para se manter nos dois dias seguintes em 39º. A 21, de manhã, apresentou 38º,5 e ás 18 1/2 horas—35º,8. A 22 encontrámos o macaco morto na gaiola.

O figado, o baço e os rins apresentavam o aspecto macroscopico caracteristico observado nos casos de febre amarella. Havia tambem hemorrhagia no estomago.

O exame histo-pathologico revelou: numerosas inclusões acidophilas intranucleares, degeneração gordurosa moderada e necrose discreta das cellulas hepaticas.

EXPERIENCIA 7—*M. rhesus* nº. 418. Temperatura inicial: 39º,1. Inoculado a 10 de Maio com excreta de 4 dos mosquitos que picaram o nº. 417.

A 14, pela manhã, apresentava 40º, mantendo-se essa temperatura até o dia 16. Neste dia foi sangrado e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 423. A 17 cahio a 39º,2 pela manhã e a 38º,7 á tarde. A 18 novamente subio a 40º,3 e a 19 a 41º,3, cahindo no dia seguinte a 37º,7, temperatura esta em que se manteve até á tarde. No dia seguinte (21) encontrámos o macaco morto na gaiola.

As visceras apresentavam lesões typicas da febre amarella, encontrando-se tambem grande parte do conteúdo estomacal denegrido. Essa verificação foi confirmada pelo exame histo-pathologico do figado, que revelou: inclusões acidophilas nucleares, necrose salpicada diminuta das cellulas hepaticas, degeneração e infiltração gordurosas e congestão.

EXPERIENCIA 8—*M. rhesus* nº. 422. Temperatura inicial: 39º,4. Inoculado a 17 de Maio, por via intraperitoneal, com sangue retirado do *rhesus* nº. 417.

A 20 apresentava, pela manhã, 40º,1 e á tarde 40º,7. A 21 baixou a 39º,6. A 22 a temperatura da manhã era de 33º, sendo então o animal sacrificado.

As visceras apresentavam lesões macroscopicas de febre amarella.

O exame histo-pathologico revelou: inclusões acidophilas intranucleares abundantes, extensa necrose das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa, congestão e infiltração por polymorphonucleares.

EXPERIENCIA 9—*M. rhesus* nº. 423. Temperatura inicial: 38º,9. Inoculado a 17 de Maio, por via intraperitoneal, com sangue retirado do *rhesus* nº. 418.

A maior elevação de temperatura observada neste macaco (40º,2) occorreu a 24 de Maio. A 25 a temperatura baixou consideravelmente e á tarde o animal foi encontrado morto na gaiola.

Apresentava pequenos fócos de peritonite, os orgãos congestos e o sangue invadido por um coccobacillo GRAM-negativo. O exame histo-pathologico revelou, como nos casos anteriores, inclusões acidophilas nucleares, necrose intensa das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa e congestão.

Pelas experiencias realisadas podemos concluir que as dejecções dos mosquitos, experimentados quando já são infectantes pelas suas picadas, como estas, são tambem infectantes.

Assim como as picadas nem sempre determinam a morte de um *rhesus*, mesmo quando o faziamos picar por varios mosquitos infectados, assim tambem as fezes podem produzir uma infecção benigna ou mesmo grave, porem sem terminar pela morte do animal inoculado. Haja vista o occorrido com os macacos das experiencias 2 e 5.

Estamos convencidos que os macacos das experiencias 1 e 2, á vista dos resultados obtidos ulteriormente e não obstante ter sido negativo o exame histo-pathologico do figado de ambos, tambem contrahiram a infecção.

Pelas experiencias aqui apresentadas verifica-se que ha toda a vantagem em sempre se colher o sangue do macaco em observação logo que se manifeste uma elevação consideravel de temperatura, para inoculal-o em outro *rhesus* e assim obter uma confirmação de que aquelle realmente se infectou, mormente nos casos de se restabelecer da infecção ou de morrer tardiamente por qualquer outra causa (2).

Rio, 29—V—1929.

NOTA ADDICIONAL—Acabámos de verificar que a diluição de excreta de mosquitos infectados, quando deposta sobre a pelle ou na conjunctiva ocular, ambas sem solução de continuidade, tambem infecta o *M. rhesus*. Neste sentido fizemos algumas experiencias que serão descriptas num proximo artigo.

---

(2) Os exames histo-pathologicos foram feitos pelo Dr. MAGARINOS TORRES, a quem deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos.

On transmission of the virus of yellow fever by excreta of infected mosquitoes [1]

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A. da COSTA LIMA.

As soon as appeared the first cases of yellow fever in Rio de Janeiro, it came to our mind to verify how the infection would result in individuals bitten by infected mosquitoes, whether exclusively by the secretion of the salivary glands of these insects, that passes along the proboscis when biting, or by the droplets of clear fluid which are always ejected through the anus, immediately after they withdraw the proboscis.

After some preliminary experiments, which have shown us the most efficient technique to be applied to, we undertook others, which we hereunder detailedly expose, and which lead us to the conclusion that dejections of infected mosquitoes, when inoculated subcutaneously, are sufficient to infect the *Macacus rhesus*.

The mosquitoes we used in these experiments (*Aëdes* (*Stegomyia*) *aegypti*) bred at the laboratory, were taken off from the common cages, transferred to glass containers of GODOY (fig. 1) and then kept supplied with honey.

In order to infect them, we applied the lower end of these containers to the skin of a monkey previously inoculated with the yellow fever virus, at the first day of fever. The infected mosquitoes were kept in these same containers until they had become infectant. Whenever we intended to perform some experiment, we removed the necessary specimens to small glass tubes (fig. 2), one of the openings of which was covered with a piece of flannel, the other one plugged with cotton-wool. The flannel shows the advantage of being rather easily passed through by the proboscis of the mosquito and not being soaked with any droplet of excreta. Each of these tubes containing a single infected mosquito, remained for one or two days in a rather not too moist chamber, and, during that time, in order to force them to bite readily on occasion of the experiment, they were not fed. We chose then two *rhesus*, one to be bitten by the mosquitoes exclusively through the pores of the flannel of the tubes; the other one to be inoculated with the dilution of excreta of the same mosquitoes. As soon as these had filled themselves with blood of the first *rhesus*, we removed the tubes from the skin of the monkey and placed them horizontally upon a stand of any kind. The mosquitoes, with their abdomen made heavy with the blood they have imbibed freely, almost do not move and after a few seconds lie on the wall of the tube. The excretion of droplets of fluid, which often begins while the insect is sucking blood, becomes more abundant when the mosquitoes are at rest. They then eject droplets, which, not seldom becoming confluent, form a small drop perfectly visible with bare

(1) Read before the Sociedade Brasileira de Biologia, May 29, 1929.

eye, and which may be easily marked with a point of ink outside the glass. We then removed the mosquitoes from the tubes, after having lightly etherized them, and gathered the material to be inoculated. For this purpose, we took a syringe containing a little sterilized water, and pressing on the piston, we allowed a small quantity of water to fall on the points where the dejections were sticking. With the tip of the needle, we made the dilution, and aspirated this again into the syringe. This operation was repeated with all the tubes, so as to gather into the syringe some material of the dejections of all mosquitoes which had bitten the first *rhesus*. We inoculated then this dilution, subcutaneously, into the other monkey, making also in its skin some scarifications on which we dropped a little of such material.

Here are summarized our observations :

EXPERIMENT 1—*M. rhesus* nº. 245. Temperature at the outset 38º.8. Bitten on the 7th January 1929 by mosquitoes which, on the 17th December 1928 had fed on the infected *rhesus* nº. 226, on the first day of fever. These mosquitoes have been, since that date, fed on honey, as we use to do with infected mosquitoes.

This animal did not show a very marked febrile reaction, the maximum having been 39º.6 on the 5th day after having been bitten. From this date, temperature went on decreasing. On the 8th day, at night, temperature had fallen to 37º.2 and the monkey was lying in the cage. He was then killed. Autopsy and histo-pathologic examination did not reveal any lesion of yellow fever.

EXPERIMENT 2—*M. rhesus* nº. 246. Temperature at the outset: 38º.5. Inoculated also on the 7th January, with a dilution of faeces of mosquitoes which had fed on *M. rhesus* nº. 245.

On the third day after the inoculation, the fever had risen to 40º and on the 4th day, to 40º.1. Hence temperature sunk forthwith, a series of small fluctuations being observed in the meantime. On the 22nd, viz. 15 days after inoculation, temperature rose again to 40º 5 oscillating, however, during the three succeeding days, between 39º.6 and 39º.4. Finally, on the 26th, it had fallen to 36º.2 the monkey looking then very weak.

By killing it on the same day, we verified that the viscera showed the characteristic appearance observed in cases of yellow fever. Nevertheless, the histo-pathological examination of the liver did not reveal the presence of the typical lesions of yellow fever.

EXPERIMENT 3—*M. rhesus* nº. 400. Initial temperature: 38º.8. Bitten on the 30th April by 6 mosquitoes which had fed on the infected *rhesus* nº. 369, on the first day of fever.

On the 5th of May, say, five days after having been bitten, it showed in the morning 40º. On the following day, temperature had fallen to 39º, rising however again, in the evening, to 40º.1. On the 7th, in the morning 40º.2 and in the evening 40º.3. On the 8th: morning 38º.8. At night, temperature had fallen to 37º.8 being then the animal killed. Macroscopically, the viscera and histopathologically, the liver, showed the presence of the typical lesions of yellow fever.

EXPERIMENT 4—*M. rhesus* no. 401. Initial temperature: 39o.3. Inoculated on the 30th of April with excreta of mosquitoes that had bitten the *rhesus* no. 400.

Two days after the inoculation, temperature had risen to 40o. From then, it oscillated between 39o.7 and 39o.5.

Killed on the 8th and autopsied, though showing a temperature of 39o.5. At the same time, we extracted blood from the heart and inoculated it into *rhesus* no. 415 for the next experiment.

The viscera looked out with normal appearance and also the histo-pathological examination resulted negative.

EXPERIMENT 5—*M. rhesus* no. 415. Temperature at the beginning: 38o.8. Inoculated on the 8th May, intraperitoneally, with blood extracted from the heart of *rhesus* no. 401.

On the 13th attained 40o.5 and that high temperature was mantained, between 40o.6 and 40o.3 on the following day.

On the 15th, in the morning, it showed 38o.5 and at 19.40 o'clock, when killed, 36o.8.

Autopsy revealed typical lesions of yellow fever, this verification being later on confirmed after histo-pathological examen of the liver. There were acidophile nuclear inclusions, scattered necrosis of the liver cells, fatty degeneration, infiltration and congestion.

EXPERIMENT 6—*M. rhesus* no. 417. Initial temperature: 38o.8. Bitten on the 10th of May by 5 mosquitoes which had fed, on the 1st April, on the infected *rhesus* no. 373, on the first day of fever.

On the 15th, at night, temperature was 39o.9. By the following days, it kept between 40o and 40o.5. On the 17th, the monkey was bled, and the blood inoculated into the *rhesus* no. 422. On the 18th, temperature rose to 40o.8 and was maintained for the two subsequent days at 39o. On the 21st in the morning, it had sunk to 38o.5. On the 22nd on the morning, the monkey was found dead in its cage.

The liver, spleen, and kidneys showed macroscopically the characteristical appearance as observed in cases of yellow fever. There was also an hemorrhage in the stomach.

Histo-pathological examination of the liver revealed: numerous acidophile nuclear inclusions, fatty degeneration and slight necrosis of the liver cells.

EXPERIMENT 7—*M. rhesus* no. 418. Initial temperature: 39.o1. Inoculated on the 10th May with excreta of 4 mosquitoes which had bitten *rhesus* 417.

On the 14th in the morning, the fever had attained 40o, and maintained itself at this degree until the 16th. By that day, some blood was taken off and inoculated into *rhesus* 423. On the 17th, the temperature sunk to 39o.2 in the morning and 38o.7 at night. On the 18th, a new rise to 40o.3 and on the 19th, to 41o.3, falling the next day to 37o.7, until at night. On the 21st, the monkey was found dead in its cage.

The viscera showed typical lesions of yellow fever and the greatest part of the material contained in the stomach had turned black by altered blood. That verification was confirmed by the histo-pathological examination

of the liver, which revealed: acidophile nuclear inclusions, slight scattered necrosis of the liver cells, fatty degeneration, infiltration and congestion.

EXPERIMENT 8—*M. rhesus* nº. 422. Initial temperature: 39º.4. Inoculated on the 17th May intra-peritoneally, with blood taken from *rhesus* 417.

It showed on the 20th, in the morning, 40º.1 and at night, 40º.7. On the 11st, temperature sunk to 39º 6. On the 22nd, in the morning, 35º.6 and at night, 33º, being then the animal killed.

The viscera showed macroscopic lesions of yellow fever.

Histo-pathological examination revealed: acidophile nuclear inclusions, extensive necrosis of hepatic cells, fatty degeneration, congestion and infiltration by polymorphonucleated leucocytes.

EXPERIMENT 9—*M. rhesus* nº. 423. Initial temperature: 38º.9. Inoculated on the 17th May, intra-peritoneally, with blood taken from *rhesus* nº. 418.

The highest temperature observed in this monkey, 40º.2, was attained on the 24th May. On the 25th, it lowered considerably, and at night, the animal was found dead in its cage.

It showed small foci of peritonitis, congested organs, and its blood invaded by a GRAM-positive cocco-bacillus. The histo-pathological examination revealed, like the former cases, nuclear acidophile inclusions, an intensive necrosis of liver cells, fatty degeneration and congestion.

From all experiments carried on, we may draw the conclusion that the dejections of mosquitoes, whose bites are already infectant, are equally infectant.

The same as what happens with bites of infected mosquitoes, which not always cause the *rhesus* to die, even when this is bitten by several insects, faeces may produce mild or severe infection, although without fatal results, the animal recovering from the infection. We need only see what happened in the case of the monkeys of our experiments 2 and 5.

We feel convinced that the monkeys of the experiments 1 and 2, considering the results obtained later on, and though were negative the histo-pathological examination of the liver of both, had contracted the disease.

From the above mentioned experiments remains demonstrated that it will be advisable to gather some blood of the monkey in observation, as soon as it shows a serious rise in temperature, inoculating this blood into another *rhesus*, in order to obtain a confirmation that the former was really infected, specially in such cases when it recovers from the infection or dies afterwards in consequence of any other cause (2).

Rio de Janeiro, May 29, 1929.

ADDITIONAL NOTE—We have lately verified that the dilution of excreta of infected mosquitoes, when put in contact with the skin or with the ocular conjunctive, proved also infective to the *M. rhesus*. In this way we made a repeated trial that will be further described in a separate article.

---

(2) The histo-pathological examinations have been performed by Dr. MAGARINOS TORRES, to whom we should like to express our heartiest thanks.

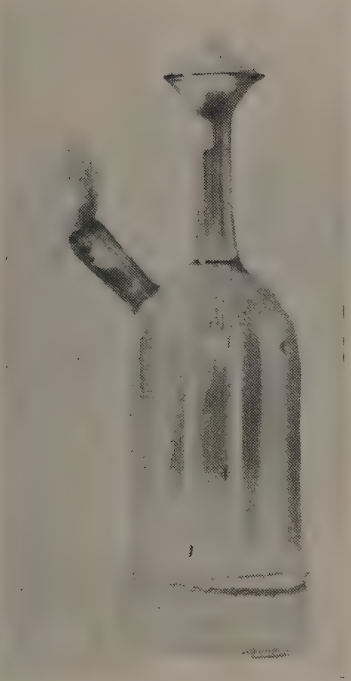


Fig. 1—Gaiola de vidro de GODOY.
Fig. 1—Glass container of GODOY.

Fig. 2—Tubo de vidro usado nas nossas experiencias (metade do tamanho natural).
Fig. 2—Glass tube used in our experiments (half the natural size).

Sobre dois scolytideos

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

No presente artigo estudo duas especies de scolytideos, uma phleophaga, outra espermophaga, que vivem em plantas de nossa flora. A primeira foi recentemente descripta por EGGERS com o nome—*Hypocryphalus mangiferae*, e foi encontrada em galhos de mangueira (*Mangifera indica*), a segunda, ainda não descripta e pertencente a um genero que me parece novo, foi por mim designada *Spermophthorus apuleiae*, por se criar em sementes de páo ferro (*Apuleia ferrea*).

Ha tempos recebera material de ambas essas especies, porém, tive que adiar a publicação desta nota pelo motivo que exporei linhas a seguir.

Quando trabalhava no Instituto Biologico de Defesa Agricola, os meus auxiliares do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal, inspeccionando pomares do Districto Federal, tiveram o ensejo de observar mangueiras cujos galhos se apresentavam mais ou menos atacados pelo primeiro insecto.

Ulteriormente foram-me remettidos da Bahia, pelo Eng. Agr. ANTONIO DE AZEVEDO, galhos da mesma planta com identica infestação.

Ao vir para o Instituto Oswaldo Cruz, revendo todo esse material, pude verificar que o causador dos damnos observados era uma nova especie de *Hypochryphalus*.

Pouco tempo depois de ter chegado a esse resultado, soube que CARLOS MOREIRA recebera tambem material do mesmo scolytideo e que, tendo-o enviado a EGGERS para determinação, d'elle obtivera a informação de se tratar d'uma nova especie de *Hypocryphalus*, designando-a *H. mangiferae*.

N'essa informação EGGERS dizia pretender incluir a descripção do insecto n'um artigo sobre scolytideos sul-americanos, a ser publicado n'um periodico scientifico de S. Paulo.

Sciente disso, escrevi a EGGERS pedindo-lhe, caso lhe conviesse, mandar-me a diagnose da sua especie, afim de incluil-a integralmente, como sua portanto, na nota em que desejava estudar não só esse, como o outro insecto a que me referi no começo deste artigo. Não logrando obter desse especialista uma resposta, senti-me, comtudo, no dever de não divulgar essa nota emquanto não fosse dada a publicidade a diagnose do insecto, reconhecido por EGGERS como nova especie antes da minha verificação.

Tendo sido publicada recentemente tal diagnose (*), posso agora livremente tratar do insecto em questão.

(*) EGGERS, H. Ipidae (Coleoptera) da America do Sul. *Arch. Inst. Biol. Def. Agric. Anim.*, I, 1928, p. 85.

Eis a descripção de EGGERS:

"*Hypocryphalus mangiferae* n. sp.

Gedrungen, graubraun, fast matt infolge dichter Punktierung, mit langen Borsten; Flügeldecken einzeln abgerundet und verkürzt, sodass das siebte Tergit vollkommen unbedeckt ist, wie bei seinen indomalayischen Gattungsgenossen.

Kopf leicht gewölbt, über dem Munde leicht eingedrückt, fein und dicht punktiert.

Halsschild breiter als lang, von den leicht gerundeten Hinterecken an allmählich nach vorne abgerundet; seitlich und hinten nicht gerandet. Am Vorderrand in der Mitte vier kleine Höcker. Oben gewölbt, ohne Buckel, fein und dicht runzelig punktiert, das vordere Drittel mit einem locker gestellten Höckerfleck, seitlich und vorne einzeln lang behaart.

Schildchen deutlich, hinten gerundet.

Flügeldecken so breit und reichlich doppelt so lang wie Halsschild, hinten breit abgerundet und an der Naht eingezogen und verkürzt. Reihenpunkte undeutlich in flachen Streifen, Zwischenräume ganz flach gewölbt, äusserst dicht fein runzelig punktiert und mit länglichen, anliegenden Grundschuppchen dich bedeckt, einreihig lang, steif behaart. Das letzte unbedeckte Tergit dicht punktiert.

Länge: 1.5 mm.

Fundort: Brasil, von C. MOREIRA an *Mangifera indica* gesammelt. Type Sammlung EGGERS".

Provavelmente o typo de EGGERS é um macho, pois as femeas tem 2 mm. de comprimento, ou pouco menos, emquanto que os machos excedem de 1,50 mm. Apresento aqui photomicrographias da antenna (fig. 4), do proventriculo (figs. 2 e 3) e da genitalia do macho desta especie (figs. 5 e 6). Junto tambem uma photographia de galhos infestados (fig. 1), pela qual se póde verificar que o insecto mina galerias irregulares, escavadas na camada cortical interna e no cambium.

O *H. mangiferae* ataca de preferencia as mudas, produzindo nestas damnos mais importantes que os observados nos galhos de plantas mais velhas.

O material que servio para os meus estudos encontra-se nos vidros ns. 218 e 219 e nas laminas 613, 615, 817-822 da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

O outro scolytideo, que aqui estudarei, ataca as favas de páo-ferro, realizando-se nas sementes o desenvolvimento do insecto.

O material que possuo foi colhido em Campos, Estado do Rio, a 26 de Agosto de 1927, pelo auxiliar do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal, JOÃO VALLIENGO JUNIOR.

Trata-se de uma especie, cujos principaes caracteres morphologicos externos, combinados com os da anatomia interna, indicam claramente que se a deve incluir nos ipineos da tribu *Pityophthori*. Nella o aspecto dos tarsos é tão singular, que me vi forçado a consideral-a como representante de um novo genero (*Spermophthorus*), evidentemente proximo do genero *Pityophthorus* EICHH. (fam. Ipidae, subfam. Ipinae).

Spermophthorus n. g.

Antennae funiculo 5 articulato, articulo 1º crassiusculo, bulbiformi, sequentibus transversis; capitulo sat magno, ovali, compresso, indistincte 4 articulato. Mentum cordatum, versus basin fortiter angustatum, lateribus rotundatum, cum ligula basi latitudine menti, antrorsum angustata, in basi menti inserta (fig. 10). *Maxillarum mala intus spinulis compressis et rigidis armata. Tibiae extus parce spinulosae. Tarsi articulis 1, 2 subaequalibus brevissimis, fere connatis, in apice tibiae subreconditis; articulo 3 longissimo. Scutellum distinctum. Elytris postice utrinque juxta-suturam sulcatis. Pygidium in parte abdominis inferiore conspicuum.*

Generis species unica—apuleiae n. sp.

S. apuleiae n. sp. (figs. 7—18)

Long. 1,75-2,3 mm.

Subelongatus, cylindricus, ferrugineo-testaceus vel nigricans. Prothorace antice concentrice exasperato, postice fortiter punctato, setis squamulaeformibus adsperso. Elytris lineato-punctatis, declivitate utrinque fortiter sulcata, interstitiis subtilissime punctulatis, squamulis flavo-auratis seriatim ornatis.

Mas.: fronte plus minusve profunde excavata.

Fem.: fronte convexiuscula, medio-carinata.

Nesta especie o tamanho dos machos, em geral, excede o das femeas. De facto, os maiores especimens da serie examinada são machos; as femeas, ou são bem menores que estes, ou tem o porte dos machos menos robustos. Aliás, esta peculiaridade interessante tambem se observa em algumas especies do genero *Pityophthorus*.

A coloração dos exemplares varia consideravelmente, provavelmente em relação com o gráo de maturidade dos mesmos. Todavia os machos, em geral, são bem mais escuros que os especimens do outro sexo.

As antennas (figs. 12 e 18) apresentam uma clava de aspecto caracteristico. As suturas são obsoletas no meio; nos bordos lateraes, porém, ha 2 manchas escleraes, visiveis em ambas as faces, contrastando fórtemente com a coloração amarellada do resto da clava.

Os elytros são distinctamente ponteados em series longitudinaes e parallelas e, nos intersticios, apresentam um pontilhado finissimo. Nos pontos seriados, inserem-se, alternadamente, uma serie de escamas, do typo representado na fig. 9, e uma outra de pelos mais curtos que aquellas. As 2 series mais externas de pontos piliferos, do meio do elytro até o sulco juxta-sutural, formam estrias, sendo mais profunda a que corre parallelamente a margem lateral do elytro.

Os urosternitos 2 e 4 são fundidos, notando-se, entretanto, a sutura que os separa. O bordo posterior do 7º é cortado circularmente, de modo a incluir a porção reflectida do pygidio, que é, assim, perfeitamente visivel na face ventral do abdomen. O aspecto dos tarsos (figs. 13, 14 e 15) é que se me afigura bem caracteristico e sufficiente para crear para esta especie um novo genero, distincto de *Pityophthorus*. De facto, neste ultimo

genero, os articulos 1, 2 e 3 são approximadamente iguaes (fig. 13, lado esquerdo). Em *Spermophthorus* os 2 primeiros articulos, sendo muito pequenos e quasi fundidos, ficam occultos sob o apice da tibia; o 3º articulo é relativamente muito grande e espesso. Pelos demais caracteres, evidentemente a especie muito se approxima de *Pityophthorus*, verificando-se que essa affinidade tambem se accentua pelo estudo da anatomia interna do insecto. O proventriculo (figs. 16 e 17) e a genitalia do macho (fig. 8) exhibem estructuras de aspecto semelhante ao que se observa n'esses mesmos orgãos em especies do genero *Pityophthorus*.

O material typico é representado por varios especimens de ambos os sexos conservados nos vidros 216 e 217 e nas laminas 616-623 e 638-845 da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

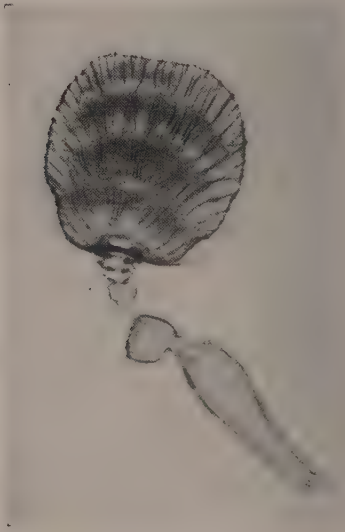
Os desenhos foram feitos a camara clara pelo autor e as photomicrographias pelo Sr. J. PINTO.

Manguinhos, 28 de Maio de 1929.

Fig. 1—Galhos de mangueira infestados pelo *Hypocryphalus mangiferae* (um pouco augmentado).

2

3



4

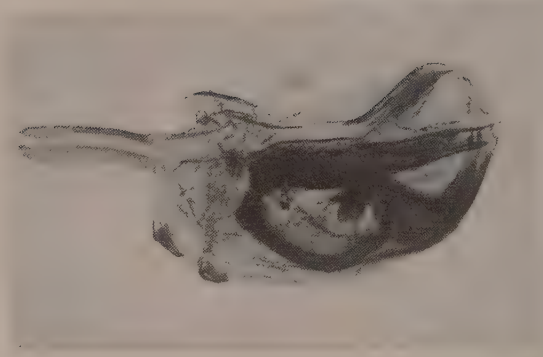
Fig. 2—Parte interna do proventriculo de *H. mangiferae* (× 260).
Fig. 3—Proventriculo de *H. mangiferae*, depois de aberto e estendido (× 100).
Fig. 4—Antenna de *H. mangiferae* (× 180).

5

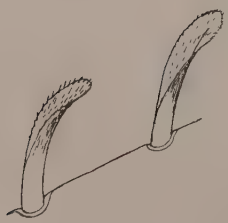
6

Figs. 5 e 6—Genitalia do ♂ de *H. mangiferae* (× 120).

7



8



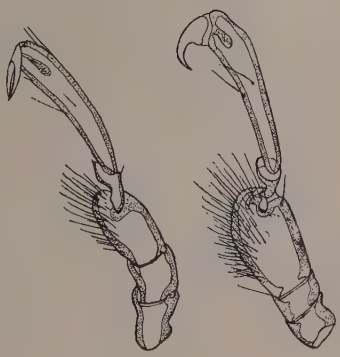
9

Fig. 7—*Spermophthorus apuleiae*. Os dois exemplares da direita são femeas (× 11).
Fig. 8—Genitalia do ♂ de *S. apuleiae* (× 180).
Fig. 9—Escamas dos elytros de *S. apuleiae*.

10

11

12



13

Fig. 10—Labium de *Spermophthorus apuleiae*.
Fig. 11—Mandibula de *S. apuleiae*.
Fig. 12—Antenna de *S. apuleiae*.
Fig. 13—Tarsos de *Pityophthorus xylotrupes* (esquerda) e de *Spermophtorus apuleiae* (direita).

14

15

Fig. 14—Perna anterior de *Spermophthorus apuleiae* (× 100).
Fig. 14—Perna posterior de *Spermophthorus apuleiae* (× 100).

16

17

18

Fig. 16—Parte interna do proventriculo de *Spermophthorus apuleiae* (× 260).
Fig. 17—Proventriculo de *S. apuleiae*, depois de aberto e estendido (× 100).
Fig. 18—Antenna de *S apuleiae* (× 180).

Estudos sobre a Lepra

III. Transmissão da lepra humana ao camondongo branco (*)

(2a Nota com 6 figuras)

Pelo Dr. H. C. de SOUZA-ARAUJO.

Tenho a honra de apresentar á Academia a minha segunda nota sobre a lepra experimental. Ella é o resumo dos protocollos das inoculações de 33 camondongos brancos, com material leproso virulento. Serão objecto de outra nota os resultados das inoculações de camondongos com material leproso avirulento, assim como as inoculações de outros animaes de laboratorio, menos sensiveis á infecção.

Technica. Os lepromas, extirpados sem pelle, são triturados em grál esterilizado, com areia e sôro physiologico. A emulsão obtida é diluida no mesmo sôro, até uma concentração conveniente, verificada ao microscopio, filtrada em algodão e inoculada o mais cedo possivel. A via preferida foi a intraperitoneal e a dose para cada camondongo de 1/2 c.c., podendo ser repetida a inoculação com o intervallo de duas a trez semanas.

Protocollos. Os trez camondongos referidos na 1a. nota (2-8-928) pertenciam aos lotes 3, 4 e 5.

Do *lote 4* constam 9 camondongos inoculados, em 3-7-928, com material de ANDRADE. Subtrahido o No. 2 da 1a. nota ficaram 8. Destes, 4 foram reinoculado em 26-7, com egual dose de material do mesmo doente.

A sorte dos 4 camondongos primitivos foi a seguinte: 1 morreu a 9-8, (com 37 dias de inoculado), apresentando *micro-abcessos nos pulmões*, ricos em bacillos acido-alcool-resistentes e *ganglios mesentericos caseificados*, com raros bacillos. Os esfregaços do figado, dos rins e do baço foram negativos.

Outro morreu a 21-8 (49 dias) apresentando apenas raros bacillos no rim e uma globia no liquido peritoneal.

O 3o, sacrificado quando agonizava, em 26-9 (53 dias), apresentava *nodulos brancos*, como grãos de areia ou semelhantes ás granulações de mycetoma, adherentes ao mesenterio, ao epiploon e ás visceras abdominaes, resistentes ao esmagamento e formados de massas de bacillos acido-alcool-resistentes e raros detrictos cellulares.

O 4o, sacrificado e necropsiado em 15-12 (165 dias), apresentava *3 micro-abcessos* no figado, identicos aos do 3o. camondongo da nota prévia, *2 nodulos brancos* eguaes aos descriptos acima, entre o pancreas e o baço e 1 terceiro adherente ao epiploon.

(*) Trabalho lido na Academia Nacional de Medicina, em 31—5—929.

Esfregaços desses nodulos revelaram *massas de bacillos* acido-alcool-resistentes. Os esfregaços do figado, do rim e do pulmão, foram negativos.

Parecendo-me de grande interesse a presença de taes nodulos desejei que os collegas do Instituto de Manguinhos os vissem *in loco* e assim a meu convite estiveram no meu laboratorio os Drs. CHAGAS, GODOY, FARIA, FONSECA e outros. D'ahi em deante o Dr. LUTZ começou a se interessar pelas minhas experiencias e os seus conselhos me teem sido de grande valia.

Dos 4 camondongos reinoculados, 1 morreu 114 dias após a inoculação (25-10), não apresentando lesões nem bacillos.

Outro, morto em 5-12 (154 dias), apezar de não apresentar lesões macroscopicas, tinha grande abundancia de bacillos em feixes e globias, nos esfregaços das visceras.

O 3º, sacrificado no mesmo dia 5-12, apresentava *nodulos minusculos* no figado, entre os lobos quadrado e o de SPIEGEL, *1 nodulo maior* (pequeno tumor) adherente ao lobo direito (V. photos 2 e 3) e outros de tamanhos varios adherentes ás dobras mesentericas e ao epiploon. Córtes desse figado revelaram granulomas de origem peripherica.

Os córtes do tumor mostram focos de necrose com espaços deixados por crystaes de cholesterina.

Um dos nodulos maiores, do figado, cortado e esmagado sobre lamina, parecia um kysto cheio de massas bacillares, especies de *globias gigantes*, nunca vistas em material humano ou experimental.

O 4º, sacrificado e necropsiado em 15-12 (164 dias), apresentava tambem taes *granulos* no figado, debaixo do lobo quadrado. Os esfregaços das visceras abdominaes destes dous ultimos animaes, a um exame microscopico rapido, não revelaram bacillos acido-alcool-resistentes.

Estes bellos resultados mostram a conveniencia das reinoculações, assumpto muito discutido na 3ª Conferencia Internacional da Lepra (Rapport, 1924, p. 117).

Do *lote 5* constam 6 camondongos inoculados, em 5-7-928, com material de HILDA, 1 dos quaes figura sob o nº. 3, na Nota prévia. O 2º, morto em 12-8 (38 dias) e o 3º, em 19-9 (76 dias), apresentavam *bacillos acido-alcool-resistentes* em esfregaços dos principaes orgãos abdominaes e tambem nos ganglios mesentericos do ultimo.

O 4º, sacrificado agonizante e necropsiado em 9-10 (97 dias), apresentava *pequeno tumor* entre o figado e o pancreas, e *micro-abcessos* no baço. Os esfregaços desse tumor, do figado, do baço e do pulmão eram ricos em bacillos acido-alcool-resistentes.

O 5º, morto em 24-11 (172 dias) apresentava *pequeno tumor no pancreas* (V. photo 4) e *8 minusculos nodulos* adherentes ás alças mesentericas e ao epiploon.

A semeadura desses nodulos em agar-manteiga deu resultado negativo.

O 6º, sacrificado e necropsiado em 23-1-929 (com 202 dias de inoculado), apresentava pontos de *necrose* no figado, *nodulos brancos* adherentes á capsula dessa glandula, e outros espalhados na cavidade abdominal. Esses nodulos foram pescados, triturados em geral e a emulsão inoculada em 2 camondongos. O resultado foi negativo.

O tumor do pancreas, acima referido, foi examinado e descripto pelo Dr. MAGARINOS TORRES, que o achou muito interessante pela presença de espaços deixados por crystaes de cholesterina. O Dr. AMADEU FIALHO, consultado tambem sobre isso, é de opinião que esse achado é uma curiosidade histopathologica.

Os 6 camondongos do *lote 7* foram inoculados em 26-7-928 com material de ANDRADE. Um delles morreu no 1º. mez e não foi examinado; outro morreu em 15-11 (112 dias) apresentando *1 nodulo* no figado, com grandes massas de bacillos acido-alcool-resistentes, e no baço zonas de necrose, com raros bacillos.

Os 4 restantes foram sacrificados e necropsiados em 15-11 (142 dias) apparentando estado normal. 3 delles tinham *nodulos* em tudo eguaes aos já descriptos.

Todos os esfregaços das visceras abdominaes foram negativos.

Os *3 camondongos* do *lote 13* foram inoculados em 23-10-928, com material de F. LOPES. Como a emulsão era pouco concentrada augmentei a dose para 1 c.c., para a injecção intraperitoneal e 1/4 c.c. dado foi por via subcutanea.

Para uma demonstração ao Dr. BORZONE, director do Instituto Bacteriologico de Santa Fé, Argentina, sacrifiquei esses 3 animaes em 24-1-929 (com 92 dias).

O 1º. autopsiado apresentava *innumeros granulos* espalhados e adherentes ao mesenterio, ao epiploon e ao figado.

Esta glandula apresentava *micro-abcessos* generalizados.

Os esfregaços dos granulos, do figado e do baço revelaram uma formidavel abundancia de bacillos acido-alcool-resistentes em feixes, em globias typicas e em massas. O Dr. BORZONE levou todo o material deste camondongo para estudar na Argentina.

O 2º. autopsiado apresentava: alguns *nodulos*, *1 tumor* adherente ao baço e á parede abdominal, 1 *abcesso* no lobo esquerdo do figado e *innumeros pequenos nodulos* debaixo deste orgão, adherente ás dobras do mesenterio, e outros espalhados sobre os intestinos, etc.

Tanto os esfregaços como os córtes desse tumor são ricos em bacillos da lepra.

O 3º. e ultimo apresentava tambem *granulos*, em menor numero, espalhados pela cavidade abdominal. Os esfregaços dos granulos, do baço e do figado foram positivos.

Os 6 camondongos do *lote 14* foram inoculados, em 27-11-928, com 1 c.c. de material de A. PARIS. 2 delles morreram a 1 e 4-12 e não foram examinados. Outros 2 morreram em 6-12 (9 dias) apresentando poucos bacillos acido-alcool-resistentes no baço de um, e no baço, rim, testiculo e liquido peritoneal do outro. Nenhum nodulo ou ganglio visivel a olho nú. O 5º, morto em 10-12 (13 dias), apresentava *1 ganglio mesenterico* bastante augmentado. Macroscopicamente as visceras pareciam normaes. Os esfregaços do ganglio, do baço, dos rins e do figado eram ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, provavelmente producto de absorpção (?). Ausencia de nodulos.

O 6º. e ultimo, sacrificado em 25-1-929 (59 dias), apresentava raros *granulos parasitarios* e *1 ganglio mesenterico* tumefacto e com alguns bacillos acido-alcool-resistentes.

O *lote 17* consta de 5 camondongos inoculados, em 22-2-929, com emulsão fresca e filtrada de lepromas que extrahi de 5 doentes do Hospital de S. Sebastião. A dose foi de 1/2 c.c.

O 1º. delles morreu em 10-3-929 (16 dias) apresentando um pequeno *tumor* junto ao figado e adherente á musculatura da parede anterior do abdomen (V. photos 5 e 6), o figado descorado, 1 ganglio mesenterico e outro inguinal augmentados.

Os córtes do tumor são muito ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, intra e extracellulares. Os esfregaços do figado, do rim, do pulmão e de um ganglio inguinal foram positivos. Os do baço foram negativos. Córtes seriados provaram que esse tumor interessava tambem o figado.

O 2º. foi sacrificado em 15-5 (52 dias) por apresentar vasta ulceração crostosa nas ancas. Apresentava *nodulos abdominaes* e bacillos nas visceras.

Os 3 ultimos camondongos foram sacrificados e necropsiados em 27-5-929 (94 dias). O 1º. apresentava varios *granulos brancos* nas alças do mesenterio e debaixo do figado, entre os lobos quadrado e de SPIEGEL, e um pequeno abcesso nesse orgão. O exame microscopico dos granulos e orgãos deu resultado positivo identico ao descripto tantas vezes acima. O 2º. camondongo tinha alguns *nodulos*, 1 delles adherente e ligando 2 lobos do figado, este orgão e o baço congestos e augmentados. Os esfregaços do figado são ricos em *massas bacillares* de enorme grandeza. O 3º e ultimo apresentava apenas *raros* bacillos no figado.

A nova serie de inoculações consta de 35 animaes injectados em 28 do expirante com emulsão de lepromas de varios doentes do Leprosario de Curupaity, Jacarépaguá, gentilmente obtidos por intermedio do Dr. THEOPHILO DE ALMEIDA.

Como se vê as experiencias continuam com maior escala.

Resumo. Dos 33 camondongos inoculados 3 não foram examinados por terem morrido muito cedo ou em dias feriados; 2 foram negativos e 28 positivos, isto é, apresentavam bacillos acido-alcool-resistentes num orgão qualquer.

Dos 28 positivos 17 apresentavam nodulos, 5, tumores e 4, microabcessos. Alguns tinham tumores e microabcessos, outros nodulos e tumores. Facto significante é a coincidencia de resultados em lotes de animaes inoculados com material de doentes varios (ao todo 9) de differentes procedencias.

Passagens. As inoculações de camondongos com emulsões de orgãos bacilliferos e de nodulos e ganglios, retirados de camondongos infectados teem sido negativas. Devo informar, entretanto, que essas passagens foram poucas (11 animaes) por economia do material, ora reservado para o musêo, sempre gasto em córtes, esfregaços e tentativas de culturas.

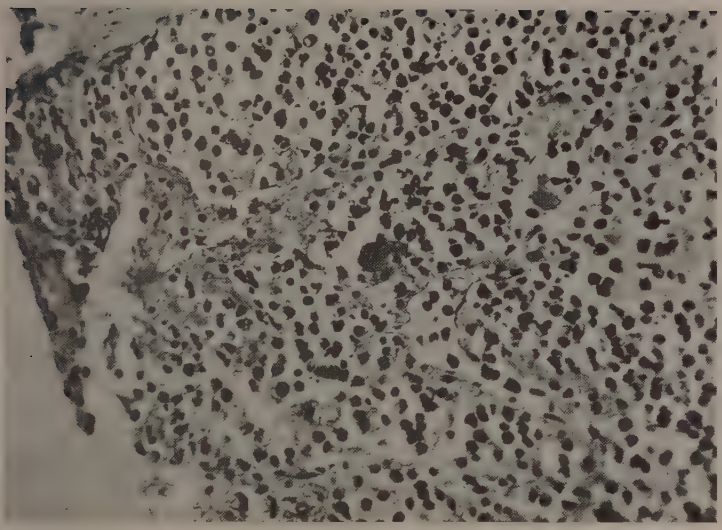


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 1. *Camondongo*. Lote 3.

Córte do tumor lymphoide encontrado adherente ao baço e á musculatura lombar. Corado pela hematoxylina-eosina.

Os esfregaços e córtes deste tumor, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram grande riqueza de bacillos acido-alcool-resistentes.

Nota : Camondongo inoculado em 6-6-928 com 1/2 cc. de emulsão de lepromas de ANDRADE. Via intraperitoneal. Sacrificado em 29-6-928 (23 dias).

Photomicrograph N. 1. *Mouse*. Lot. 3.

A cut of the lymphoid tumor found sticking to the spleen and the lumbar musculature. Stained by hematoxylin-eosin.

The rubbings and sections of this tumor, stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed a great richess of acid-alcohol-fast bacilli.

N. B.—Mouse inoculated on 6. 6. 1928 with 1/2 cc. of an emulsion of lepromas of ANDRADE. Via intraperitoneal. Killed on the 29 6. 1928 (23 days).

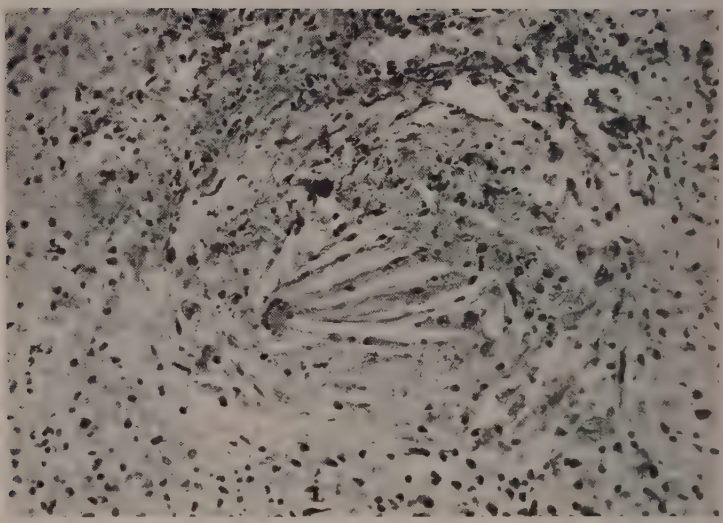


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 2. *Camondongo*. Lote 5.

Córte de tumor do pancreas, corado pela hematoxylina-eosina, mostrando um aspecto lymphoide e espaços deixados pelos crystaes de cholesterina. Este camondongo apresentava 8 nodulos adherentes ao epiploon e ao mesenterio. Os esfregaços das visceras, dos nodulos e ganglios, esfregaços e córtes do tumor, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram grande abundancia de bacillos acido-alcool-resistentes. Córtes seriados desse tumor, reproduzidos em desenho, mostram o abarrotamento do tecido pelos bacillos.

Nota : Camondongo inoculado em 5-7-928 com 1/2 cc. de emulsão de lepromas de HILDA, por via intraperitoneal. Morto em 24-11-928 (após 145 dias).

Photomicrograph N. 2. *Mouse*. Lot 5.

A section of a pancreatic tumor, stained by hematoxylin-eosin, showing a lymphoid aspect, and the spaces left by crystals of cholesterin. This mouse showed 8 nodules sticking to the epiploon and the mesentery. Rubbings of viscera, of the nodules and the ganglia, stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed abundant acid-alcohol-fast bacilli. Seriated cuts of this same tumor, represented in drawing, show the over whelming of the tissue with bacilli.

N. B.—Mouse, inoculated 5. 7. 1928 with 1/2 cc. of the HILDA's emulsion of lepromas, intraperitoneally. Died on 24. 11. 1928 (after 145 days).

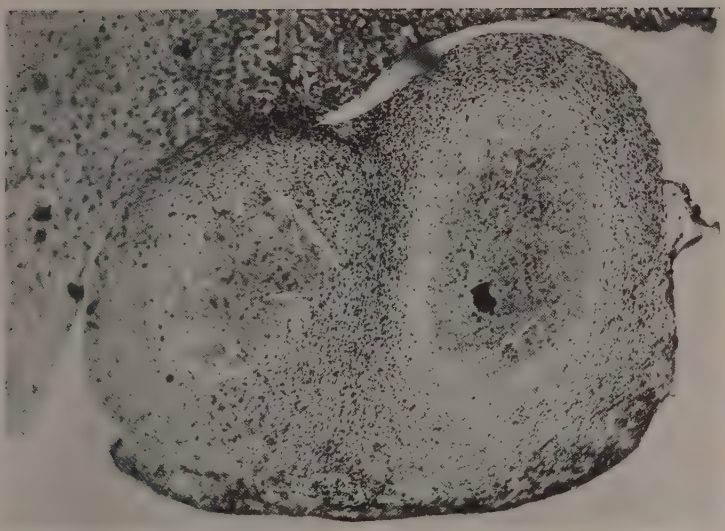


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 3. *Camondongo*. Lote 4.

Córte de tumor encontrado adherente ao lobo direito do figado, apresentando fócos de necrose com espaços deixados pelos crystaes de cholesterina. Corado pela hematoxylina-eosina. O mesmo orgão apresentava 3 granulomas (V. photo 4), sendo 2 superficiaes e 1 interno, no lobo esquerdo. Os esfregaços e córtes desse tumor e do figado, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram grande abundancia de bacillos acido-alcool-resistentes, isolados, em feixes e em globias.

Este animal apresentava mais 2 nodulos adherentes ao epiploon.

Nota : Camondongo inoculado em 27-6-928 com 1/2 cc. de emulsão fresca de lepromas de ANDRADE, por via intraperitoneal. Sacrificado em 5-12-928. (Após 154 dias).

Photomicrograph N. 3. *Mouse*. Lot 4.

A cut of a tumor found sticking to the right lobe of liver, showing foci of necrosis with spaces left by crystals of cholesterin. Stained by hematoxylin-eosin. The same organ showed 3 granulomata (S. phot. 4), being 2 superficial and 1 internal, in the left lobe. The rubbings and cuts of this tumor and of the liver, stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed to a big extent acid-alcohol-fast bacilli, isolated, in bundles and in "globies".

The same animal bore also 2 nodules sticking to the epiploon.

N. B.—Mouse inoculated on 27. 6. 1928 with 1/2 cc. of a fresh ANDRADE's emulsion of lepromas, intraperitoneally. Killed on 5. 12. 1928 (after 154 days).

Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 4. *Camondongo.* Lote 4.

O mesmo animal da photographia N. 3.

Granuloma lepromatoso do figado, de origem peripherica. Tudo como na photomicrographia N. 3.

Photomicrograph N. 4. *Mouse.* Lot 4.

The same animal as in photogr. N. 3.

A lepromatous granulom in the liver, of peripheric origin. All else as in photomicrograph N. 3.

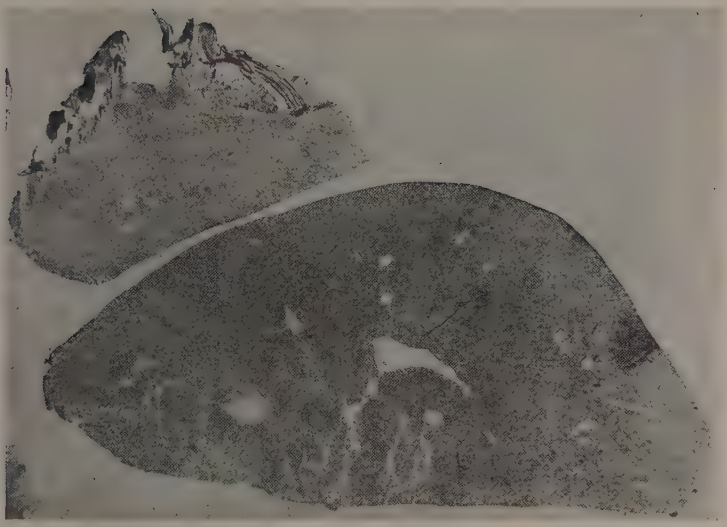


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 5. *Camondongo*. Lote 17.

Córte de tumor encontrado junto ao figado (parte interessando esta glandula) e adherente á musculatura da parede anterior do abdomen, como se vê pelas fibras musculares do córte. Os esfregaços do tumor, dos ganglios inguinaes e mesentericos, do rim, do figado e do pulmão deste animal, são tambem ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, em feixes e em globias.

Nota: Camondongo inoculado, por via intraperitoneal, em 22. 2. 929, com emulsão de lepromas 5 doentes do Hospital S. Sebastião. Morto em 10-3-929.

Photomicrograph N. 5. *Mouse*. Lot. 17.

A section of the tumor found close to the liver (the part that interests this organ) and sticking to the musculature of the anterior wall of the abdomen, as is seen by the muscular fibres in the cut. The rubings of the tumor, of the hip ganglia, mesenteric ganglia, of the kidney, liver and lung of this animal, show also abundance of acid-alcohol-fast baclili, in bundles and in "globies".

N. B. - Mouse, inoculated intraperitoneally, on 22. 2. 1929 with an emulsion of the lepromas from 5 patients of the St. Sebastian Hospital. Died 10. 3. 1929.

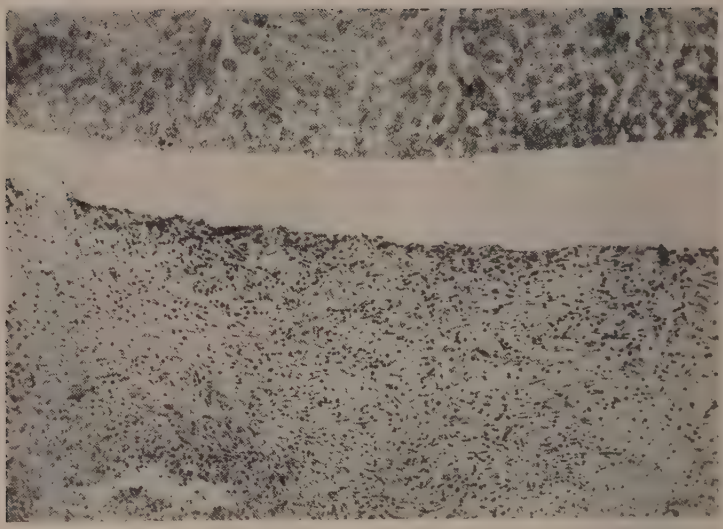


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 6. *Camondongo*. Lote 17.

O mesmo animal da photomicrographia N. 5.

Photomicrographia mostrando a predominancia de fibroblastos no tumor de recente formação. Apresenta dous fócos de necrose. Tumor riquissimo em bacillos acido-alcool-resistentes.

Nota: Veja a da figura N. 5.

Photomicrograph N. 6. *Mouse*. Lot 17.

The same animal as in photomicrograph N. 5.

This photomicrograph shows the prevalency of fibroblasts in the recently formed tumor. Two foci of necrosis are observed. This tumor was very rich in acid alcohol-fast bacilli.

N. B.—Refer to the note at foot of fig. N. 5.

Os nodulos. Duas classes de nodulos ou granulos tenho observado: uns brancos, muito resistentes, verdadeiras massas bacillares, semelhantes aos grãos de mycetoma, de tamanho variavel, ora soltos, ora adherentes ás visceras abdominaes; outros, acinzentados, mais molles e ás vezes friaveis, adherentes ao mesenterio ou ao epiploon, contendo menos bacillos e algumas cellulas ou detrictos: devem ser ganglios mesentericos ou epiploicos muito hypertrophiados.

Nos camondongos normaes esses ganglios não são facilmente visiveis a olho nú. Os granulomas do figado me parecem ser de origem peripherica, pela proliferação de um daquelles nodulos que adherem fortemente á sua capsula. Não se nota cirrhose do figado, nem degeneração das cellulas hepaticas, nos casos estudados.

Tumores. Pequenas neoformações tenho encontrado adherentes ao baço, ao pancreas, ao figado e á musculatura abdominal. Primeiramente parecem ser fibroblastomas, depois tumores lymphoides, sempre ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, intra e extracellulares. Mais tarde apparecem outros typos de cellulas em redór dos fócos de necrose de caseificação, tendo no centro espaços deixados pelos crystaes de cholesterina.

Segundo o Dr. MAGARINOS TORRES a extructura de um desses tumores, (o do pancreas) o unico que elle examinou, não apresentava: "*o aspecto histologico de folliculos tuberculosos typicos*".

Cholesterina foi verificada em tumores do figado e do pancreas.

Sabemos que este alcool monatomico provem, na sua maior parte, da secreção interna das capsulas supra-renaes e é eliminada pela bile; que a sua acção defensiva contra as intoxicações externas e infecções é poderosa; e que ella existe em excesso no sangue de leprosos activos.

Como explicar a sua presença nos tumores dos camondongos das nossas experiencias?

Só a continuação desses estudos poderá esclarecer o caso.

Trouxe á Academia *factos*, que reputo de certa importancia.

As conclusões ficam para o futuro.

Manguinhos, 31 de Maio de 1929.

Studies upon Leprosy

III. Transmission of Human Leprosy to white Mouse (*)

(2nd Note with 6 figures)

By H. C. de SOUZA-ARAUJO, M. D., Dr. P. H.

I shall have the honor to read before this Academy my second note upon experimental leprosy. It is a summary of the results of inoculations in 33 white mice with virulent leprotic material. In a further note, I shall deal with the results of inoculation of mice with avirulent leprotic stuff, as also with inoculation of other laboratory animals, less sensible to the infection.

Technique. The lepromas, extirpated without any skin, are triturated in a sterilized mortar, with sand and saline solution. The emulsion thus obtained is then diluted in the same solution up to a convenient concentration, which is verified by means of the microscope, filtrated afterwards on cotton, and inoculated as quickly as possible. Intraperitoneal injection was the preferred way, the dose for each mouse being half a cubic centimetre, this inoculation being allowed to be repeated after two or three weeks.

Results. The three mice referred to in my previous note (2. VIII. 1928) belonged to the lots 3, 4 and 5.

Lote 4 consisted of 9 mice, inoculated on the 3. VII. 1928, with ANDRADE's material. The No. 2 of the first note, having been withdrawn, there remained 8 mice, of which 4 were inoculated again, on the 26. VII. 1928 with the same dose and the same material of the same patient.

The sort of the four primitive mice was the following: one died on the 9. VIII. (after 37 days inoculation), showing *micro-abscesses in the lungs*, rich in acid-alcohol-fast bacilli, and *caseated mesenteric ganglia*, with but few bacilli. Smears of the liver, kidneys and spleen remained negative.

Another died on the 21. VIII. (49 days) showing hardly some scarce bacilli in kidney and a "globie" in the peritoneal fluid.

The 3rd, killed in the agonic period, on the 26. VII. (53 days) showed *white nodules* sand-stone-like or similar to granulations of mycetoma, sticking to the mesentery, to the epiploon and the abdominal viscera, being squash-proof and formed with masses of acid-alcohol-fast bacilli, and very scarce cellular detritus.

The fourth, killed and necropsied on the 15. XII. (165) showed *three micro-abscesses* in the liver, identical to those of the third mouse

(*) Read before the National Academy of Medicine, Rio de Janeiro, on the 31st May 1929.

stated in my previous note, *two white nodules* equal to those described above, between the pancreas and the spleen and a third one sticking to the epiploon.

Smears of those nodules revealed *masses of acid-alcohol-fast bacilli.* Rubbings of liver, kidney and lung remained negative.

The presence of these nodules appeared to me of such high interest, that I wished my colleagues of the Oswaldo Cruz Institute to see them *in loco*, and upon my invitation to do so, Dr. CHAGAS, Dr. GODOY, Dr. FARIA, Dr. FONSECA and others came to my laboratory. Since then, Dr. LUTZ began to show interest for my experiments, and I greatly availed myself of his valuable advices.

Of the 4 re-inoculated mice, one died 114 days later (25. X.) without showing either lesions or bacilli.

Another, which died on the 5. XII. (154 days), though not showing any macroscopic lesion, revealed in great abundance, bacilli in bundles and "globies" in rubbings of viscera.

The third, killed on the same day (5. XII) showed *minim nodule*s in the liver, between the square lobe and the SPIEGELII, *one bigger nodule* (small tumor) sticking to the right lobe (See microphotographs 2 and 3) and others of various sizes sticking to the mesenteric folds and to the epiploon. Sections of the same liver revealed granulomae of peripheric origin.

Sections of the tumor show necrotic foci with spaces left by crystals of cholesterin.

One of the biggest nodules of the liver, being cut and squashed on a glass platen, appeared like a cystic swelling full with bacillary masses, a kind of *giant "globies"* which were never to be seen, either in human or experimental material.

The 4th, killed and necropsied on the 15. XII. (164 days) aslo showed such *granules* in the liver, just below the square lobe. Smears of abdominal viscera of the last two animals, colored by ZIEHL-NEELSEN, on a first rather quick examination, did not reveal acid-alcohol-fast bacilli.

These encouraging results demonstrate the convenience of re-inoculations, a matter which has been much discussed about at the 3rd International Conference of Leprosy (Rapport, 1924, p. 117).

Lot 5 consists of 6 mice, inoculated on the 5. VII. 1928, with HILDA's material, one of which named as N. 3 in my previous note. The 2nd, which died on the 12. VIII. (38 days) and the 3rd on the 19. IX. (76 days), showed acid-alcohol-fast bacilli in rubbings of the main abdominal organs, as also, with regard to the second, in the mesenteric lymphnodes.

The 4th, killed when in agony and necropsied on the 9. X. (97 days) showed a *slight tumor* between the liver and the pancreas, and *micro-abscesses* in the spleen. Rubbings of this tumor, of the liver, of the spleen and of the lung were rich in acid-alcohol-fast bacilli.

The fifth, died on the 24. XI. (172 days) showed a *small tumor in the pancreas* (See microphotograph n. 4) and *8 minim nodules* adhering to the mesenteric folds and to the epiploon.

The inoculation of these nodules on butter-agar resulted negative.

The 6th, killed and necropsied on the 23rd of January 1929 (after 202 days from the inoculation) showed some *necrosed* spots in the liver, *with nodules* adhering to the liver capsule, and other scattered about in the abdominal cavity. These nodules were taken off, triturated in a mortar and the emulsion injected into two mice. The result was negative.

The tumor of the pancreas above referred to was examined and described by Dr. MAGARINOS TORRES, who judged it most interesting, owing to the presence of spaces left by crystals of cholesterin. Dr. AMADEU FIALHO who was also applied to in this respect, is of the opinion that this discovery is a real histopathologic curiosity.

The 6 mice of the *lote* 7, were inoculated on the 26. VII. 1928 with ANDRADE's material. One of them died on the first month and was not examined; another died on the 15. XI. (112 days) showing *one nodule* in the liver, with big masses of acid-alcohol-fast bacilli, and, in the spleen, zones of necrosis with but few bacilli.

The other four were killed and necropsied on the 15. XI. (142 days) appearing as in normal condition. In 3 of them, there were *nodules* absolutely alike to those already described.

All the rubbings of abdominal viscera proved negative.

The *3 mice* of *lot 13*, were inoculated on the 23. X. 1928 with material of F. LOPES. As the emulsion was of a weak concentration, I increased the dosis to 1 c.c. for intraperitoneal injection and gave more 1/4 of a c.c. subcutaneously.

With the purpose of a demonstration to Dr. BORZONE, the Director of the Bacteriological Institute, Santa Fé, Argentine Republic, I killed these three animals on the 24th of January 1929 (92 days after inoculation).

The first autopsy allowed us to see *innumerable granules* scattered about and sticking to the mesentery, to the epiploon and to the liver.

The latter gland showed generalized *micro-abscesses*.

The rubbings of the granules, of the liver and the spleen, revealed a huge quantity of acid-alcohol-fast bacilli in bundles, in typical "globies" and in masses. Dr. BORZONE took the whole material of this mouse with himself for studying purpose, on his way back to Argentine.

The second we autopsied showed: a few *nodules*, one *tumor* sticking to the spleen and to the abdominal wall, one abscess in the left lobe of the liver and *innumerable small nodules* just below this organ, adherent to the fan-shaped fold of peritoneum and other scattered in the intestine, etc.

Both rubbings and cuts of this tumor proved to be rich in bacilli of leprosy.

The third and last one allowed us to observe also *granules*, in smaller quantity, scattered in the abdominal space. The rubbings of the granules, of the spleen and the liver were positive.

The 6 mice of *lot 14* were inoculated, on the 27. XI. 1928, with 1 c.c. of the material of A. PARIS. Two of them died on the first and 4th December, and were not examined. Two other, died on the 6. XII. (9 days after inoculation) one of them showing a few acid-alcohol-fast bacilli in the spleen, the other in the spleen, kdney, testicle and peritoneal fluid. No

nodule or ganglia were to be observed with bare eye. The 5th, died on the 10. XII. (13 days) and showed *one mesenteric ganglion* rather increased. Viscera examined macroscopically appeared as normal. Rubbings of ganglia, spleen, kidneys and liver were rich in acid-alcohol-fast bacilli, which was probably a product of absorption (?). No nodules were observed.

The 6th and last, killed on the 25. I. 1929 (59 days) showed rare *parasite granules* and *one mesenteric ganglion* very enlarged, with a few acid-alcohol-fast bacilli.

Lot 17 comprised 5 mice, inoculated on the 22. II. 1929 with a new and filtrated emulsion of lepromas which I had extirpated from 5 patients at the St. Sebastian Hospital. The dosis was 1/2 c.c.

The first of these died on the 10. III. 1929 (16 days) showing a small *tumor* close to the liver and sticking to the musculature of the front wall of the abdomen (see microphotographs 5 and 6), liver discolored, one mesenteric ganglion and another groin ganglion were enlarged.

Sections of the tumor proved to be rich in acid-alcohol-fast bacilli, intra and extra-cellular. Rubbings of the liver, kdney, lung and of a inguinal ganglion were positive, those of the spleen proving negative.

The 2nd was killed and on the 15. V. (52 days) when it showed a large crusted ulceration in the hips. We observed in the viscera bacilli and also *abdominal nodules.*

The last three mice were killed and necropsied on the 27th May 1929 (94 days). I saw in the first one various *white granules* in the folds of the mesentery and under the liver between the square lobe and the lobe of SPIEGEL, also a small abscess in the liver. The microscopical examination of the granules and organs gave a positive result, equal to that described repeatedly here above. The second mouse had a few *nodules,* one of which sticking to and binding two lobes of the liver, this organ as also the spleen being congested and increased. The rubbings of the liver were rich in *bacillar masses* of gigantic size. The last third showed hardly *few* bacilli in the liver.

The new series of inoculatinos consisted of 35 animals, injected on the 28th of May with an emulsion of lepromas from a number of patients of the leprosarium at Curupaity, Jacarépaguá, which were kindly handed to me by Dr. THEOPHILO DE ALMEIDA.

As is patent, our experiments are being carried on on a larger scale.

Summary. Of the 33 inoculated mice, 3 were not examined, on account of having died too early or during holidays; 2 remained negative and 28 positive, that is, showed acid-alcohol-fast bacilli in either organ.

Of the 28 positive, 17 had nodules, 5 had tumors, and 4 had micro-abscesses. Some ones had tumors with micro-abscesses, others nodules with tumors. A noteworthy fact is the coincidence between the results of lots of animals which were inoculated with material from various patients (in the whole 9) and coming from different states.

Passages. The inoculations of mice with emulsions of bacilliferous organs and of nodules and lymphe-nodes, extracted from infected mice

have remained negative. I must state, in fact, these passages were but very few (11 animals) owing to scarcity of material, which was either reserved for the museum, or and always for cuts, rubbings and attempts of cultures.

The nodules. I observed nodules or granules of two classes: some ones white, highly resistent, real bacillary masses, with some resemblance with grains of mycetoma, of varied size, either loose, or sticking to the abdominal viscera; others, ash-grey, softer, sometimes friable, adhering to the mesentery or the epiploon, containing less bacilli and a few cells or detritus: these should be mesenteric or epiploic ganglia very hypertrophied.

In normal mice, such ganglia are not likely to be seen with bare eye. The granulomas of the liver seem to me as of peripheric origin, in view of the proliferation of one of these nodules which are strongly sticking to the liver capsule. No cirrhosis of the liver nor degeneration of hepatic cells has been found in the cases I studied.

Tumors. Small neo-formations have been found sticking to the spleen the pancreas, the liver and the abdominal walls. At first, it seems these would be fibroblastomae, afterwards, lymphoid tumors, always rich in acid-alcohol-fast intra and extra-cellular bacilli. Later on, other types of cells appear all around the foci of caseating necrosis, with in their centre, spaces left by crystals of cholesterin.

According to Dr. MAGARINOS TORRES, the structure of one of these tumors, one of the pancreas, the only one he examined, did not show "*the histologic aspect of typical tuberculous follicles*".

Cholesterol was verified in tumors of the liver and the pancreas.

We know this monoatomic alcohol is provenient mostly from the internal secretion of bile the adrenals, being eliminated by the bile; also that its defensive action against external intoxications and infections is a powerful one; and that it exists in excess in the bood of active lepers.

What then may account for the presence of this stuff in the tumors of mice in our experiments?

Only further studies will enable us to throw some light hereon.

Bringing this before the Academy, I confined myself in exposing *concrete facts*, which I deem of a certain importance.

Future only may enable to draw conclusions.

Manguinhos, 31st of May 1929.

Studies upon Leprosy

I. Transmission of Human Leprosy to the white Mouse (*) (Preliminary note, with 7 figures).

By H. C. de SOUZA-ARAUJO, M. D., Dr. P. H.

(*Reprinted*)

On perusing again literature about experimental transmission of human leprosy and murine leprosy to laboratory animals, I verified the frequent mistaking the "Hansenian infection" and "provokind leprosy", which are far from being synonymous, for, in my opinion, nobody has still obtained the transmission of "human leprosy" to white mouse.

LITERATURE

In 1902, T. SUGAI (1) inoculated human leper material to Japanese dancing mice, and obtained, in about 20 of them, an infection followed by lepromatous infiltration of the viscera, containing numerous bacilli. The author reports that, the death of the animals took place between the 19th and the 104th day of the inoculation, but does not describe cutaneous lesions.

CHARLES W. DUVAL (2) succeeded likewise in infecting this variety of mouse, either with his culture of the bacillus of leprosy, or with leproma emulsion. The incubation stage lasted from 4 to 6 weeks; DUVAL states he reproduced "the disease in the Japanese dancing mouse", which animal he considers as a test material. Nor does he describe any cutaneous lesion. As to the white mouse, white and grey rats, etc., his renewed attempts to infect such remained unsuccessful.

W. J. KEDROWSKY (3) made use of his culture known as "bacillus of leprosy" after a passage through Guinea pig, and succeeded in infecting three white mice. KEDROWSKY affirmed reservedly, before the Third International Conference of Leprosy (1923), basing himself on this preliminary attempt of 1903 or 1904, which remained pending, owing to the Russo-Japanese War, he had been successful in inoculating leprosy to rabbits and mice (J'ai réussi à inoculer la lèpre aux lapins et aux souris, Page, 32, Rapport). In this author's opinion, the best infection way for rats and mice is the ocular mucosa.

MARCHOUX and SOREL (4) verified that the white mouse *can be* infected with murine leprosy, without generalization of the bacilli, as observed in rats.

With material from the corpse of a man who had died from murine leprosy, showing granulous bacilli in the viscera, MARCHOUX obtained

(*) Paper read before the National Academy of Medicine, Rio de Janeiro, August 2, 1928. The original was published in Portuguese in this supplement, Nº. 1, of August 1928.

the infection of 5 out 6 white rats he had inoculated. MARCHOUX proved therefore that granulous bacilli are not "cadavers" as some leprologists would pretend, and that murine leprosy can, occasionally attack man. Anyhow, he did never succeed in transmitting human leprosy to rats or mice.

Struck with this fact, MARCHOUX (6) undertook in 1925, numerous researches, inoculating white rats and Guinea pigs with fresh material of human leprpsy, with a view to make certain the bacilli of leprosy are and the same in both diseases. He did not come, nevertheless, to any result.

K. HARADA (7) using his own culture of the bacillus of leprosy, told me he had obtained the infection in rats, the result being : death after the 30th day. I have no idea, what kind of rats he used for his experiments.

MUIR, HANDERSON and LANDEMAN (8) obtained experimental infection in 97.7 o/o of the white rats and decumanus inoculated with *Bacillus leprae murium,* with formation of abdominal tumors, meanwhile MUIR and HANDERSON (9) came to negative results in inoculating material ef human leprosy to Japanese dancing mice, white rats and Chinese hamster (*Cricetulus griseus*).

ANGELO H. ROFFO (10) had no better success with 100 rats he inoculated in 1927 with leproma emulsions, from various patients, rich in bacilli.

This summary of the literature on the subject is necessary for a better appreciation of some points of my own experiments.

MY EXPERIMENTS

With an emulsion of a leproma scratched out from the back of the hand of Dr. J. P. A. (of Minas Geraes) (see figs 1 and 2) rich in bacilli, I inoculated on the 6th of June of 1928 :

1) One monkey *Pseudo-cebus* with
   1 c.c. in the malar region, subcutaneously, and
   1 c.c. intraperitoneally ;
2) One white rat with
   1 c.c. intraperitoneally ;
3) Three white mice each of them with
   1/2 c.c. intraperitoneally.

Results after 23 days, say, on the 29th of June 1928:

a) The monkey shows a nodule in the face. The same monkey had undergone a former inoculation with leproma from another patient, on the 3rd February, in the face and peritoneum. On the 18th of March, he showed two small nodules on his forehead, these having disappeared after one month. The first infection was patent after 45, the second after 23 days.

b) The white rat does not show abnormality whatever.

c) Of the two mice, one died on the day next to the inoculation. The other showed on the 23rd a fistula between the lower right ribs. The liquid gathered herefrom with a platinum rod, after disinfection of the spot, was very rich in acid-fast bacilli and globoid masses (see fig. 3). The animal

who grew rather ill, was then killed, and I found an *abdominal tumor*, one centimetre long, half as wide, sticking on the spleen, affecting the peritoneum and the lumbar musculature. Smears of this tumor, of the abdominal ganglia, of the spleen and liver, showed many acid-alcohol-fast bacilli, most of which in fasciae, also in the form of globoid masses. Macroscopically, the liver appeared normal, though being the most infected organ. Sections of this tumor—of lymphoid constitution—of the spleen and kidneys, which I am indebted for to the kindness of Dr. BURLE DE FIGUEIREDO, revealed to my examination, in larger extent the former two, abundance of acid-fast bacilli in fasciae, of normal appearance.

Here is a case of generalized "Hansenian infection".

The presence of globoid masses (zoogleic masses, the "globies" of MARCHOUX, *specific of human leprosy) in the liver, spleen and ganglia, proves the multiplication of the bacillus in situ, according to* WADE's *affirmation, and this is not a case of murine leprosy.*

With an emulsion of viscera of this animal, I inoculated three mice one Guinea pig and one white rat. Two of the former died accidentally, the other one is well, the same as the Guinea pig.

The rat showed, 18 days afterwards, an abdominal subcutaneous nodule which grew up to the size of an olive. On the 24th day, I decided to extirpate this tubercule for culture purposes and found it caseified. Smearings of the pus and of the abdominal scratches showed some acid-alcohol-fast bacilli, pigmented, with the appearance of real degeneration, as also a big globoid mass, with granulous bacilli.

*
* *

On the 3rd of July, I extracted, without skin, two more lepromas from the same patient Dr. J. P. A. After preparing the emulsion of same, which was rich in bacilli, I repeated the culture in various media, and inoculated 9 white mice and one Guinea pig intraperitoneally. Half 1/2 was injected to the mice, and one 1 c.c. to the Guinea pig. On the 17th of same month, one of the mice showed a dermic nodule on its back and another in the right scapula, both of the size of a pea; also a smaller one on the abdomen. There was a complete alopecia on both former elements. (See Photo n. 6).

On the 20th, these nodules showing tendency to diminish, I then decided to extirpate the dorsal one for culture purposes, but found it caseified. A summary examination of the pus did not prove this to be bacilliferous. Being the animal killed, I found the liver and spleen hardly congested and increased in size. Smears from the liver, spleen and kidneys showed some acid-alcohol-fast bacilli, scattered into groups of 2 to 4, segmented or granulous, proving an advanced degeneration.

The production of dermic nodules, similar to lepromas, accompanied with complete alopecia in loco, induces me to consider the case one of transmission of human leprosy to the white mouse.

*
* *

On the 5th of July, I extracted two blooming lepromas from Miss H. S. (of Minas Geraes). With the emulsion of one of them, I inoculated, intraperitoneally, 6 white mice. Dose for each of them: half c.c. I left the other leproma to stay in pure alcohol, for 36 hours, after which I triturated it and passed it into an emulsion, inoculating then three other mice (witnesses), with the same dose and in the same way as the former. The emulsion of leproma treated by alcohol was also rich in bacilli, of a morphological appearance equal to that of fresh material. On the 27th in the morning, one of the first 6 mice happened to have died. Necropsy revealed: liver and lungs covered with micro-abscesses (aspect of granulia); the other viscera with normal appearance. (See fig. 7). Smearings from lungs, liver, spleen, abdominal ganglia, kidneys and testicle showed acid-alcohol-fast bacilli, single and in fasciae. The kidneys showed masses of bacilli. Smears from the micro-abscesses showed apparent heaps of acid-alcohol-fast bacilli with microscopic fields of 3 to 5 "globies" (see fig. 4).

I decided to keep the piece intact for the Museum of the Institute.

Examining again to-day all the other inoculated animals—about 30 in all—I found no case of apparent illness.

CONCLUSIONS

1) The inoculation of emulsion of lepromata to white mouse, intraperitoneally, produces either a mere generalized infection, causing death within 3 or 4 weeks, or an infection characterized by a tumor, micro-abscesses or dermic nodules.

2) The presence of "globies" in the tumor, micro-abscesses and nodules in the viscerae, proves a real multiplication of Hansen's bacillus in the animal.

3) The transmission of the infection from the white mouse to the white rat was positive.

4) The verification of the infectableness of the white mouse through Hansen's disease, has opened a wide field of experimentation for the study of the etiopathogeny of leprosy.

Manguinhos, 31st of July 1928

BIBLIOGRAPHY

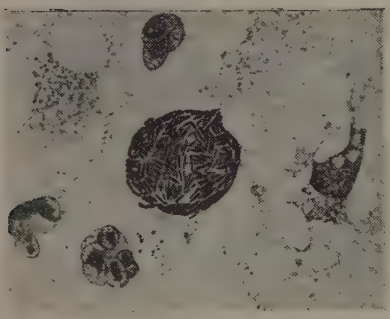
1) Sugai, T.,—Gelungen Uebertragungsversuche mit lepra bei Säugetieren. LEPRA, Vol. 8, Fasc. 3, P. 157, 1909.

2) Duval, Charles W.,—The cultivation of leprosy bacillus and the experimental production of leprosy in the Japanese dancing mouse.
Jour. Experim. med. Vol. 12, p. 649, New York 1910.

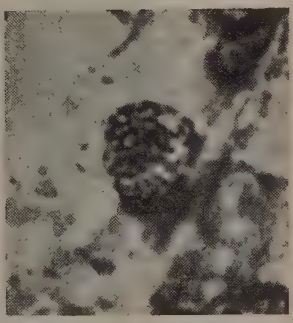
3) Kedrowsky, W. J.,—Experimentalle Untersuchungen ueber Lepra-impfungen bei Tieren. Zeitsch. f. Hygiene und Infektkrank., Vol. 66, pp. 1—97, 1910, e p. 32 IIIe Conf. Intern. de la lèpre (1923) Rapport. Paris 1924.

1

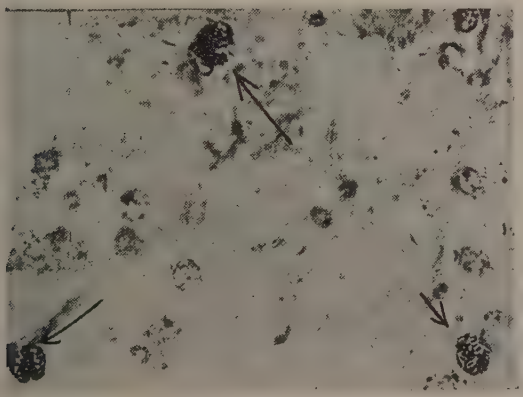
2



3



4



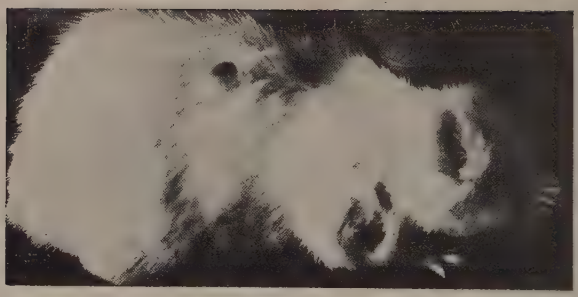
5 Phots J. Pinto

Fig. 1—J. P. A., a leper since 26 years, who provided material for infecting a monkey, white mice, and a white rat (the latter by passage).

Fig. 2—Design of smearings of the inoculated leproma emulsion. (Immersion 1/12 and ocular 15).

Fig. 3—A "globie". Design of the smearings of the secretion of the fistula in the first infected mouse. Largely magnified.

Fig. 5—Globoid masses. Microphotograph of smearings of micro-abscesse of the third infected mouse.



6

7

Phots J. Pinto

Fig. 6--Second mouse infected with material from the patient J. P. A. Nodules on the back, right scapula and abdomen. Acid-alcohol-fast bacilli in the viscera.

Fig. 7—Third mouse infected with human leprosy. The micro-abscesses of the lungs and liver were rich in globoid masses.

4) Marchoux et Sorel. – Lepra, tomo XIII, p. 171, 1913. La lèpre des rats.
5) Marchoux, E., – La lèpre du rat et sa transmission probable a l'Homme. IIIe. Conférence Internationale de la lèpre. Rapport, p. 109, Paris, 1924.
6) Marchoux, E. Unicité ou pluralité des bacilles lépreux. Bull. Acad. Med. Vol. 94, N. 39, p. 1091, 1925.
7) Harada, K., *in* Cultura do bacillo da lepra (H. C. de Souza-Araujo). Brazil Medico, de 5 de Março de 1927.
8) Muir, Herderson and Landeman.,—Tumor-like growths caused by intraperitoneal inoculation of *B. leprae murium*. Ind. Jour. med. Res., Vol. XV, p. 15, 1927.
9) Muir, E. and Henderson, J. M., – Rat Leprosy etc. Indian jour. med. Res. V. XV, N. 3, p. 807, 1928.
10) Roffo, A. H., – Sobre la transmission de la lepra a los monos inferiores. Bol. Inst. Medicina Experim., N. 15, Jan. 1927. B. Aires.

Nova contribuição para o conhecimento do cyclo evolutivo das Holostomideas ou Strigeidas.

Communicação preliminar do Dr. ADOLPHO LUTZ.

Em 1921 fiz no Centralblatt fuer Bakteriologie etc., Parte I, Vol. 86, p. 124, uma communicação preliminar em que mostrei que o genero *Holostomum* ou *Strigea* tinha cercarias de cauda bifida que não se enkystavam logo ao penetrar em um segundo hospedador, porém viviam bastante tempo livres nos tecidos em fórmas que chamei de precysticas, porque acabavam formando *Tetracotyles* enkystados, depois de passar por uma phase opaca e mostrando pouca estructura. Uma dellas, que se parecia muito com a conhecida *Tetracotyle typica*, transformava-se no intestino de patinhos em *Strigea* pequena, parecida com a *S. cornuta* RUD., confirmando uma observação de ERCOLANI. A grande *Tetracotyle* das sanguesugas transformou-se, em pintinhos, numa pequena *Strigea*, parecida com uma observada espontaneamente em *Gallinula galeata* e num pequeno socó. A gyrinipeta foi acompanhada até um certo ponto de evolução, faltando os ultimos estados, o que se explica por observações posteriores.

Contra a minha espectativa, a minha nova orientação, embora bastante revolucionaria, não encontrou contradictores sendo hoje geralmente acceita.

Continuando as minhas observações, encontrei, nos primeiros annos, mais de vinte especies de cercarias de cauda bifida que, com poucas excepções, deviam pertencer a holostomideos. Algumas destas se distinguiam facilmente, outras, do typo de *C. gracilis* LA VALETTE, tinham a estructura tão pouco differenciada que eram mais caracterisadas pelos dous primeiros hospedadores ou pela difficuldade de encontrar o segundo hospedador. Por isso pesquizei tambem, nas mesmas regiões, *holostomidas* adultos e *Tetracotyles* que serviam para experiencias de infecção.

Em molluscos de agua doce, as *tetracotyles* eram frequentes, mas apparentemente eram todas da mesma especie já mencionada. Nas sanguesugas encontrei uma segunda especie, microcystica, reconhecida apenas pelo exame microscopico. Não obstante um material abundante, não consegui determinar o hospedador definitivo. Os gyrinos se deixavam infectar por varias especies que não chegaram á formação de *tetracotyles*. O mesmo se deu com peixinhos, embora mostrassem alguma attracção. Cobras não se infectavam pela pelle nem pela bocca. Com injecção rectal de uma *dicranocercaria*, que não procurava os outros animaes experimentados, obtive apenas um principio de infecção parenchymatosa. Quanto á mammiferos e aves nenhuma das cercarias experimentadas procurava penetrar por sua pelle.

Entretanto, observava *tetracotyles* legitimas em tamboatás (*Callichthys*), raras vezes em rãs, mas frequentemente em cobras aquaticas, varias vezes em

passaros aquaticos e tres vezes em mammiferos carnivoros: duas em raposas (*Canis Azarae*) e uma em *Grison vittatus*, erroneamente conhecido pelo nome vulgar *furão*. Todas estas especies, menos a das rãs, foram usadas para experiencias em urubús, gaviões e corujas, não se notando differenças nos resultados, obtidos sempre com facilidade. Com trinta-reis (*Sterna*) obtive num urubú grande numero de *Strigeas* adultas, a que dei o nome provisorio de *Strigea ornithocystis*, talvez identica com *Strigea falconis var. brasiliana* SZIDAT. As outras especies, que designei como *ichthyocystis*, *ophiocystis* e *theriocystis*, todas correspondem ao typo de *Holostomum vaginatum* BRANDES, que provavelmente comprehende mais de uma especie. *Ichthyocystis* é a menor; das outras talvez *theriocystis* seja um pouco maior, podendo alcançar quasi um centimetro, em preparação de balsamo, com o cone genital completamente sahido. As experiencias repetidas excluem qualquer confusão e a procedencia deve separar as trez especies, não obstante a sua grande semelhança. A *Strigea*, encontrada por SZIDAT entre as especies colleccionadas por NATTERER e tendo como hospedador *Dicholophus cristatus*, deve ser a minha *Strigea ophiocystys*, porque a Seriema é grande comedora de cobras.

No correr das minhas experiencias encontrei varias vezes distomulos livres na musculatura de gyrinos e batrachios, que lembravam as observações semelhantes de GASTALDI na Italia, e, em menor grau, os distomulos descobertos por DUNKER na carne de porco. Na zona do instituto, o material era escasso e foi encontrado em *L. ocellatus*. Achei a mesma especie em *Hyla rubra* do Estado de S. Paulo. Outra especie com as glandulas salivares ao lado e em frente do acetabulo que lembrava o *Agamodistomum marcianae*, foi observada em muitos exemplares de *Leptodactylus pentadactylus* da Bahia. Estes trematodes achavam-se livres, principalmente no tecido interfibrillar dos musculos, e mostravam grande vitalidade.

A organisação destes pequenos trematodes, posto que rudimentar, é muito clara, ao contrario do que se dá com as dicranocercarias correspondentes, em que os detalhes são difficilmente percebidos. Sem o conhecimento de certas experiencias, seriam naturalmente classificados como verdadeiros distomulos, o que se fez até agora, mas as experiencias indicaram que se tratava da phase de evolução de um trematodeo como já reconheceram CORT e BROOKS. Todavia a carne infectada era dada a varios animaes sem que se obtivesse algum holostomideo intestinal.

Em Julho de 1928 estive em Natal, onde achei a *Hyla crepitans* muito abundante. Os adultos tinham na carne muitos agamodistomos do typo observado no Rio, que só podiam provir de uma pequena Dicranocercaria de *Planorbis anatinus*, tambem já observada. Do dia 12 em diante alimentou-se um pombinho com carne destas *Hylas* adultas e com gyrinos infectados da mesma especie. No dia 18 o pombinho, examinado, não mostrou nada no intestino, porém, nos tecidos em redor do figado e do esophago, achou-se todo o cyclo evolutivo desde a fórma intramuscular das rãs até á outras opacas e granulosas que, precedem a formação de *Tetracotyles* parecidas com *T. typica*. A fórma enkystada não foi encontrada ainda, mas teria certamente apparecido um ou dous dias depois. Encetei immediatamente nova experiencia com um patinho que foi examinado depois de 12 dias e outro

que foi conservado vivo para ser levado para o Rio por mar, emquanto eu voltava de aeroplano.

No primeiro patinho encontrámos grande numero de *Tetracotyles*, bem visiveis porque estavam dentro de kystos bastante grandes, apparentemente formados pelo hospedador. Eram localisadas principalmente no pescoço e no tecido subcutaneo. Na falta de uma ave appropriada, os tecidos infectados foram dados para um gatinho que devia ter seguido para o Rio, mas que se extraviou antes do embarque. O patinho, embora bem recommendado, foi roubado a bordo. Recomecei as experiencias no Rio com alguns dos batrachios de Natal, dados a dous patinhos; infelizmente ratos selvagens mataram-nos antes do tempo necessario para a formação dos *Tetracotyles*.

Estes accidentes não prohibem considerar o cyclo fechado, visto já ter obtido não sómente a *Strigea ornithocystis* adulta como tambem a infecção de rãs com dicranocercarias por via experimental.

O facto de haver Trematodeos que vivem em *quatro* hospedadores differentes parece completamente novo. É tambem muito interessante que um dos hospedadores intermediarios possa pertencer á mesma classe ou a uma classe mais elevada que o hospedador definitivo.

Segundo CORT e BROOKS os agamodistomos das rãs engulidas por cobras passam para os tecidos destes. Assim talvez fosse facil verificar-se até cinco hospedadores.

Em occasião opportuna espero completar estas experiencias e fazer uma exposição mais detalhada e accompanhada de gravuras sobre os meus estudos a respeito os holostomideos.

Rio de Janeiro, 14 de Junho de 1929.

Inhalt der vorstehenden vorlaeufigen Mitteilung:

Neuer Beitrag zur Kenntnis des Entwicklungszyclus der Holostomiden oder Strigeiden.

Von Dr. ADOLPHO LUTZ.

Anknuepfend an seine erste Mitteilung im "Centralblatt fuer Bacteriologie", Bd. 86, 1921, erwaehnt Verf. verschiedene Holostomidencercarien, mit denen Infektionsyersuche angestellt wurden. Die erzielten *Tetrakotylen* wurden in Voegeln zu *Strigeaarten* erzogen. *Tetrakotylen* wurden auch direkt beobachtet und zwar in einem Suesswasserfisch *(ichthyocystis)*, in Batrachiern (*batrachocystis*), in Schlangen (*ophiocystis)*, Wasservoegeln (*ornithocystis*) und in Raubtieren (*Canis Azarae* und *Grison vittatus*). Letztere erhielt den vorlaeufigen Namen *theriocystis*. Mit Ausnahme der zweiten, spaerlich gefundenen Art wurden saemmtliche in *Falconiden*, *Vulturiden* und *Strigeiden* erzogen. Diese erwiesen sich als gleichwertige Wirte; doch wurde *Catharista atrata* am meisten benutzt. *Ornithocystis* erwies sich als der *Strigea falconis var. brasiliensis* SZIDAT aehnlich oder gleich; die drei uebrigen entsprachen alle dem Typus von *H. vaginatum* BRANDES, doch war *ichthyocystis* kleiner und *theriocystis* wohl etwas groesser. Die von NATTERER in *Dicholophus cristatus*, einem bekannten Schlangenfresser, gefundene und von SZIDAT angefuehrte, zu *S. vaginata* gerechnete Art duerfte wohl der *ophiocystis* entsprechen.

Ausser Tetrakotylen und erwachsenen *Strigea*formen wurden auch wenigstens zwei *Agamodistomum*arten in der Musculatur von Batrachiern beobachtet und mit Gabelschwanzcercarien in Verbindung gebracht. Sie incystirten sich nicht und die experimentelle Verfuetterung ergab keine Dermparasiten; dagegen erzielte ein in Natal mit Material von *Hyla creptans* gemachter Versuch an einer ganz jungen Taube, der sechs Tage dauerte, alle Uebergaenge zu der opaken Trematodenform, welche der Bildung typischer *Tetrakotylen* vorausgeht. Ein zweiter Versuch mit einem Entchen ergab nach 12 Tagen zahlreiche, sehr deutliche *Tetrakotylen*, die in blaeschenaehnlichen Cysten eingeschlossen, besonders in der Naeche des Oesophagus und im subcutanen Zellgewebe lagen. Die Verfuetterung derselben misslang wegen Verlusts der Versuchstiere und neues Material konnte bisher nicht beschafft werden. Doch kann der Entwicklungszyklus durch die frueheren Versuche mit *ornithocystis* als geschlossen betrachtet werden. Die zu dieser Art gehoerige Dicranocercaria ist sehr klein und wurde sowohl in Natal, als in Rio, in *Planorbis anatinus* D'ORBIGNY gefunden.

Damit duerfte die hoechst merkwuerdige Tatsache erwiesen sein, dass es Trematoden gibt, deren Entwicklung sich auf *vier* Wirte verteilt. Zu diesen duerfte auch *ophiocystis* und *theoriocystis* gehoeren. Von den verschiedenen Gabelschwanzcercarien, die nach meinen Beobachtungen in Kaulquappen eindringen, scheint nur eine *Tetrakotylen* in Batrachiern zu bilden, waehrend es andre wohl erst in einem spaeteren Wirte tun.

Sobre a infecção do M. RHESUS pela deposição de fezes de mosquitos infectados sobre a pelle ou na conjunctiva ocular integras (1).

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA.

Proseguindo no plano de experiencias que vimos emprehendendo, relativas á infecção do *Macacus rhesus* pelas fezes de mosquitos infectados, procurámos verificar se a diluição de fezes, obtida segundo a technica descripta no nosso trabalho anterior (2), poderia tambem infectar o *rhesus*, quando deposta sobre a pelle ou na conjunctiva ocular, apparentemente sem qualquer solução de continuidade. Escolhemos para isso dois macacos, depois de termos verificado, com o auxilio de uma lente binocular, a integridade das regiões que iam receber o liquido infectante.

No primeiro, *rhesus* nº. 427, instillámos algumas gottas desse liquido numa das conjunctivas e no outro, *rhesus* nº. 428, deixámos cahir a outra parte do liquido sobre o tegumento intacto da região inguinal, sem arrancamento ou raspagem dos pêlos dessa região.

Fizemos a diluição empregando excreta de 9 mosquitos infectados no *rhesus* nº. 373, a 18 de abril, colhidas pouco depois daquelles terem picado uma cobaya sã.

Ambas as experiencias foram iniciadas a 21 de maio.

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* nº. 427. Temperatura: 38º,8.

Nos 2 dias que se seguiram e até o dia 28 a temperatura não foi além de 39º,8. A 29, porém, ascendeu a 40º,3, sendo o macaco sangrado no coração e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 443. A 30 baixou a 40º,1 e a 31 a 39º. D'esse dia em deante houve ligeiras fluctuações thermicas em torno de 39º. A 4 a temperatura baixou a 37º,8, sendo então o macaco sacrificado.

As visceras apresentavam-se como nos casos de febre amarella. Todavia o exame histo-pathologico mostrou o seguinte: arranjo das traves conservado; infiltração gordurosa periporta. Não havia inclusões nucleares, nem necrose das cellulas hepaticas.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* nº. 443. Inoculado a 29 de maio com 5 cc. de sangue retirado do *rhesus* n. 427. Temperatura 39º,2.

A 2 de Junho, ascendeu a 39º,9, a 3 a 40º,7 e, á tarde do mesmo dia, a 41º. A 4 baixou a 37º. A's 15 horas o macaco foi sacrificado. Lesões macroscopicas typicas.

(1) Entregue para publicação em 16 de Julho de 1929.

(2) ARAGÃO, Dr. H. BEAUREPAIRE e COSTA LIMA, Dr. A. da.—Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados. Apresentado á Sociedade Brasileira de Biologia, em sessão de 29 de Maio de 1929 e publicado no *Brasil-Medico*, 1929, XLIII, 24, 15 de Junho, 669-671 e no *Supplemento das Memorias*, Instituto Oswaldo Cruz, 8, 22 de Junho de 1929, 101-108, 2 figs.

O exame histo-pathologico do figado revelou: inclusões nucleares, extensa necrose e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas. Fócos de infiltração por polymorpho-nucleares.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* nº. 428, sobre cujo tegumento deixámos a referida diluição cerca de meia hora, soltando-o depois na gaiola. Nos dias seguintes e até o dia 27, apresentou temperaturas ou superiores de alguns decimos, ou pouco inferiores a 39º. A 28 a temperatura subio a 40º,3, descendo, no dia seguinte, a 40º, sendo então o macaco sangrado e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 445.

A 30, pela manhã, encontrámos o macaco morto. As visceras apresentavam o aspecto typico que se observa nos casos de febre amarella, notando-se abundante hemorrhagia no estomago. O exame histo-pathologico do figado confirmou essa verificação, notando o Dr. M. TORRES o seguinte: desarranjo das traves, intensa necrose, degeneração gordurosa das cellulas do figado e inclusões nucleares. Congestão.

EXPERIENCIA 4. *M. rhesus* nº. 445. Inoculado a 29 de Maio com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* nº. 428. Temperatura no inicio da experiencia: 39º,3. No dia seguinte 39º,6 e a 31, 39º,7. A 1º de Junho a temperatura ascendeu a 40º,5. No dia immediato, isto é, 3 dias depois da inoculação, encontrámos o macaco morto na gaiola, sendo autopsiado tardiamente.

O exame histo-pathologico revelou: "inclusões nucleares pouco numerosas nas cellulas hepaticas, que apresentavam degeneração parenchymatosa. A necrose das cellulas do figado não poude ser devidamente apreciada" (TORRES).

Embora as experiencias acima demonstrem claramente que um ataque de febre amarella pode ser obtido no *rhesus* pela simples deposição de fezes infectantes na conjunctiva e na pelle, nós considerámos necessario repetir aquella que se referia a esse ultimo modo de transmissão.

Com esse objectivo foram usados 2 macacos, nº. 448 para ser infectado pela picada através de uma flanella e nº. 449 para ser infectado pela simples deposição de fezes sobre a pelle intacta.

EXPERIENCIA 5. *M. rhesus* nº. 449. Sobre a pelle do pescoço deste macaco foram depositadas, no dia 3 de Junho á tarde, algumas gottas de uma diluição de excreta expellidos por 9 dos mosquitos usados na experiencia de controle nº. 7.

Sendo possivel que o macaco houvesse arranhado o ponto em que fora depositado o virus, examinamol-o, na manhã seguinte, e verificámos que a pelle estava absolutamente integra. A temperatura era de 39º2. Nos dias seguintes, até 7 de Junho, nenhuma elevação acima de 39º3. Neste dia a temperatura se elevou a 40º,1 e o animal foi sangrado no coração. No dia seguinte a temperatura foi de 40º, no dia 9 baixou a 39º,5 e assim se manteve por 2 dias. Nos dias 12 e 13 nova elevação a 40º,2, sendo o macaco de novo sangrado no coração. Até o dia 20 a temperatura se manteve entre 39º e 40º. No dia 21 a temperatura era de 39º,7 e para sabermos se este *rhesus* no. 449 estava immune foi elle injectado com 0,5 cc. de sangue contendo virus do *rhesus* nº. 476. Nos dias 22 e 23 a temperatura se elevou acima de 39º,5; no dia 24 subiu a 40º,3 e no dia 25 a 40º,9 para cahir a 38º,3 no dia 26. No dia 27 o macaco foi encontrado morto na gaiola.

A autopsia revelou lesões macroscopicas typicas e o exame histo-

pathologico do figado deu o seguinte resultado: "intensa degeneração gordurosa e discreta necrose das cellulas hepaticas. Numerosas inclusões nucleares especificas" (TORRES).

Surge aqui a questão de se saber si o *rhesus* nº. 449 estava infectado com o material de excreta depositado sobre a pelle ou o foi sómente pelo virus do *rhesus* nº. 476.

A experiencia subsequente vae nos tirar essa duvida.

EXPERIENCIA 6. *M. rhesus* nº. 467 foi injectado por via subcutanea em 14 de Junho com 1 cc. de uma mistura dos sangues do *rhesus* nº. 449 colhidos em 7, 12 e 13. Temperatura: 39º.

No dia 14 a temperatura do macaco era de 39º,4 e no dia 15 de 40º, temperatura essa que se manteve por 7 dias com pequenas oscillações.

No dia 23 de Junho a temperatura foi de 39º,8 e no dia seguinte cahiu a 38º,6. O macaco morreu durante a noite apresentando as visceras todas as apparencias de febre amarella. O exame histo-pathologico do figado mostrou extensa necrose das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa, corpusculos intranucleares e congestão.

Esta experiencia demonstra que o *rhesus* nº. 449 estava de facto infectado com o virus da febre amarella anteriormente á inoculação do sangue do *rhesus* nº. 476, que o superinfectou.

EXPERIENCIA 7. *M. rhesus* nº. 448. Foi picado em 3 de Junho por 12 mosquitos (as dejecções de 9 destes mosquitos foram usadas na experiencia 5) que tinham picado 28 dias antes o *rhesus* infectado nº. 405. Temperatura 39º.

As primeiras elevações de temperatura foram pouco accentuadas até os dias 7 e 8 em que ella se elevou a 39º,9. Desta data até a 21 a temperatura, ora baixa, ora alta, não excedeu a 39º,9. No dia 21, estando o macaco com 39º,2 foi elle inoculado com 1 cc. de sangue do *rhesus* infectado nº. 476, não tendo o macaco apresentado nenhuma reacção em seguida a esta inoculação ao contrario do que aconteceu com o *rhesns* nº. 449, como já ficou anteriormente assignalado.

O resultado desta experiencia mostra a possibilidade de uma infecção benigna num *rhesus* que foi picado por 12 mosquitos que 28 dias antes tinham sugado um *rhesus* infectado.

Em vista dos resultados acima citados nós estamos convencidos que os excreta de mosquitos infectados, quando simplesmente collocados sobre a pelle integra, são sufficientes para produzir casos de febre amarella experimental no *Macacus rhesus*.

On the infection of M. RHESUS by contact of the uninjured skin and conjunctiva with the excreta of infected mosquitoes. (1)

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A da COSTA LIMA

Continuing with our projected experiments on the infection of *M. rhesus* by excreta of infected mosquitoes, we have considered it advisable to test whether the dilution of that material, obtained by working according to the technique described in our previous paper (2), could also infect the monkey if put in contact with the skin or in the conjunctiva, without injuring the epithelium.

For this purpose we have chosen 2 monkeys and verified, with the aid of a binocular lens, that the parts intended for the experiments were quite intact.

The first *rhesus*, nº. 427, was tested by puting a few drops of the infecting dilution in one of the conjunctival sacs; in the other one, *rhesus* nº. 428, put also some drops of the same fluid in contact with the skin of the inguinal region, where they remained for about half an hour. The dilution was prepared with excreta of 9 mosquitoes which had bitten *rhesus* nº. 373 on 18th April and fed, at the moment of the experiment, on a guinea-pig.

Both experiments began on May 21, 1929.

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* nº. 427. Temperature: 38º.8.

On the two following days and up to 28, the temperature did not exceed 39º.8. On the 29th, however, the temperature had risen to 40º.3; the monkey was then bled and its blood injected into *rhesus* nº. 443. On the 30th the temperature fell to 40º.1 and to 39º on the 31st. From this date forward it showed slight fluctuations near 39º. On June 5, the temperature had fallen to 37º.8 when the monkey was killed.

The autopsy showed the viscera as in yellow fever cases; therefore, the histo-pathological examination of the liver, made by Dr. TORRES revealed: the outlines of the liver cells preserved; fatty infiltration arround the portal veins; neither intra-nuclear bodies, nor necrosis of the liver cells.

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* nº. 443. Inoculated on May 29 with 0.5 cc. of blood taken from *rhesus* nº. 427. Temperature: 39º.2.

June 2, its temperature was 39º.9, on the following day 40º.7 in the morning and 41º on the afternoon. On June 4, the temperature had fallen to 37º. At 3 p. m., the temperature was 35º, when the monkey was killed.

---

(1) Received for publication July 16, 1929.

(2) ARAGÃO, Dr. H. de BEAUREPAIRE e COSTA LIMA, Dr. A. da—Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitoes infectados. Red before the Sociedade Brasileira de Biologia, May 29, 1929. Published in *Brasil-Medico*, 1929, XLIII, 25, June 15, 669-671 and also in *Supplemento das Memorias* of the Instituto Oswaldo Cruz, 8, June 22, 1929, 101-108, 2 figs.

The histo-pathological examination of the liver revealed: acidophile intra-nuclear bodies, extensive necrosis and fatty degeneration of the liver cells. Foci of infiltration by polymorphonucleated leucocytes.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* 428, whose skin was in contact for nearly half an hour with the dilution of excreta, was set at liberty in its cage.

On the following days and until the 27th May it showed fluctuations of temperature either somewhat above or a little below 39°. On the 28th the temperature had risen to 40°.3, falling the next day to 40°. The monkey was then bled and the blood used for inoculating *rhesus* n°. 445. On the 30th, in the morning, it was found dead in the cage.

The viscera showed the typical aspect observed in yellow fever and the stomach was almost filled with black material.

The histo-pathological examination of the liver showed disarrangement of the columns of hepatic cells, with extensive necrosis and fatty degeneration of the hepatic cells; intranuclear bodies. Congestion,

EXPERIMENT 4. *M. rhesus* n°. 445. Injected on May 29, with 0.5 of blood taken from the *rhesus* n°. 428. Temperature 39°.3. On the following day 38°.6; on the 31st: 39°.7. On June 1, the temperature had risen to 40°.5. On the next day, the third day after the monkey had been inoculated, we found it dead in the cage. It was autopsied too late.

The histo-pathological examination revealed: nuclear inclusions not abundant. The liver cells showed parenchymatous degeneration. Dr. TORRES could not perfectly observe the necrosis of those cells.

Though the experiments above described conclusively demonstrate that an attack of yellow fever may be induced in the healthy *rhesus* by simple contact of infected feces with conjunctiva or uninjured skin, we have considered it advisable to repeat the experiment relative to the last mentioned manner of transmission.

For this purpose we used 2 monkeys: n°. 449, for beeing infected, through the intact skin, by yellow fever virus contained in excreta and n°. 448, for beeing infected by the bite of the mosquitoes that had expelled such excreta.

EXPERIMENT 5. *M. rhesus* n°. 449. Received on the afternoon of June 3, on the skin of the throat, some drops of a dilution of excreta, expelled by 9 of the mosquitoes used in the control experiment n°. 7.

On the morning of the following day, as it was possible that the monkey had scratched itself, we examined again the contaminated region of the skin, having verified its integrity.

Temperature: 39°.2. On the first days following contamination the record of temperature showed no rise above 39°.3, till June 7 when the temperature was 40°.1. The monkey was then bled. On the next day temperature was 40°, and 39°.5 on the 9th. This temperature was maintained for the two subsequent days. On the 12th and 13th a new rise of temperature to 40°.2. By that occasion the monkey was bled again. From that date until the 18th the temperature varied from 39° to 40°, this temperature being again observed on the 19th and 20th.

On June 21 (temperature 39°.7), the monkey was given a subcutaneous injection of 0.5 cc. of blood obtained from infected *rhesus* n°. 476.

On the two following days the temperature did not exceed 39o.5. On the 24th again the temperature rose to 40o.3 and on the 25th to 40o.9. On the 26th, at noon, it sunk to 38o.3. On the 27th the monkey was found dead in its cage.

The histo-pathological examination of the liver revealed: "extensive fatty degeneration and slight necrosis of liver cells. Many hepatic cells show intranuclear bodies" (TORRES).

The question here naturally arises: the monkey was already infected when it was reinoculated with infected blood on the 21st June, or it became infected by that blood? It was solved by the subsequent experiment.

EXPERIMENT 6. *M. rhesus* nº. 467, on June 13th, injected subcutaneously with 1 cc. of blood, taken, on the 7th, 12th and 13th, from *rhesus* nº. 449. Temperature 39o.

On June 14, 39o.4. On the 15th, 40º; this temperature was maintained for the 7 subsequent days at about the same degree or with small fluctuations until June 23rd. On this day, the temperature had fallen to 39o.8. On the next day it sunk to 38o.6, and the monkey died during the night.

The histo-pathological examination of the liver showed: "extensive necrosis and fatty degeneration of the liver cells; intranuclear bodies; congestion" (TORRES).

EXPERIMENT 7. *M. rhesus* nº. 448. Was bitten on June 3 by 12 mosquitoes (the excreta of 9 of these mosquitoes were used in experiment 5) that had 28 days previously bitten infected *rhesus* nº. 405. Temperature 39º.

The first rise of temperature, wich was somewhat fluctuant in character, did not reach its height until June 7th or 8th, when the temperature was 39o.9. From that date until 21st the temperature, always somewhat fluctuant, did not exceed 39º.9. On the 21st (temperature 39º.2) the monkey was inoculated subcutaneously with 0.5 cc. of blood of the *rhesus* 476, without showing any signs of infection.

The result of this experiment shows the occurrance of a mild case of yellow fever produced by the bite of 12 mosquitoes that have fed on an infected monkey 28 days previously.

In the light of these results we feel convinced that excreta of infected mosquitoes, when simply put in contact with the uninjured skin, are sufficient to produce cases of yellow fever.

Sobre o tempo necessario para que Stegomyias infectados excretem fezes virulentas (1)

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA

Tendo em trabalhos anteriores demonstrado a infecciosidade dos excreta de mosquitos cuja picada era egualmente infectante procurámos em seguida verificar qual o resultado que seria obtido com material de mosquitos com menos de 9 dias de infecção, que é o minimo demonstrado necessario para a transmissão pela picada.

As experiencias nesse sentido feitas, embora ainda não tenham dado o prazo minimo necessario á transmissão pelas fezes, demonstram no emtanto que pelo menos 5 dias após a picada ellas já são infectantes. Isto nós verificámos em 2 casos e em outro foi igualmente possivel obter a infecção com excreta do 7º dia. A seguir vamos tratar dessas experiencias e de outras feitas com o fim de confirmar e completar esses resultados.

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* nº. 434. Temperatura 39º. Foi inoculado em 25 de Maio com uma emulsão de excreta de 6 mosquitos que foram alimentados 5 dias antes com sangue do *rhesus* nº. 422 quando apresentava 40º de temperatura. Com o fim de usar excreta frescos no momento da experiencia os mosquitos foram alimentados em uma cobaya. Nos 4 dias seguintes temperatura normal. No dia 30 de Maio temperatura 39º,9 para cahir no dia seguinte a 38º,8. O *rhesus* foi sangrado no dia 31 de Maio e o sangue inoculado no *rhesus* nº 447. A temperatura do *rhesus* nº. 434 se manteve proxima á normal dahi em diante. No dia 12 de Junho o *rhesus* foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* infectado 464, cuja temperatura na occasião era de 39º,9. Seis dias depois a temperatura se elevou a 40º para cahir na normal nos dias segnintes. No dia 29 de Junho inoculámos este macaco com 1 cc. de sangue do *rhesus* infectado 480. A primeira elevação thermica foi observada em 4 de Julho (40º,1). No dia 5 o macaco teve 40º,9 de febre. No dia 6—40º,5; no dia 8 ás 11 horas da manhã o animal foi morto.

Exame histologico do figado: "Extensa necrose e degeneração gordurosa das cellulas do figado. Inclusões nucleares" (TORRES).

A experiencia acima referida não provou que o *rhesus* estava infectado antes da inoculação do sangue. Acreditamos no emtanto que ha algumas razões para suppôr a occurrencia de uma infecção muito benigna no *rhesus* depois da inoculação com excreta. De facto, o resultado da experiencia seguinte parece confirmar essa suspeita.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* nº. 447. Temperatura 38º,7. Foi injectado em 31 de Maio, por via subcutanea, com 0,5 cc. do sangue do *rhesus* nº. 434. Este macaco mostrou febre sómente no dia 5 de Junho (39º,8). Desde esse dia até o dia 12 houve apenas algumas oscillações entre 39 e 39º,5. No

(1) Entregue para publicação em 20 de Julho de 1929.

dia 13 a temperatura se elevou a 39º,9 e no dia 14 a 40º,8; a 15—39º; a 16—40º,5; a 17—39º,9; a 18—39º,2; a 19—39º,9; a 20—40º; a 21—39º,4. Neste dia o macaco foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* infectado 476 e não apresentou mais reacção alguma.

Este caso parece ter sido uma forma de caracter benigno porém mais severo que o do *rhesus* no. 434. Nós procurámos tambem provar o poder infectante dos mosquitos que serviram nesta experiencia e assim o *rhesus* nº. 457 foi inoculado no dia 8 de Junho com uma emulsão de 3 mosquitos que sobreviveram.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* nº. 457. Inoculado como acima foi dito em 8 de Junho. Até o dia 14 nenhuma alteração notavel de temperatura. Nesse dia a temperatura cahiu a 37º,8 pela manhã, mas á tarde já tinha voltado á normal e assim se manteve até 21 de Junho, quando se elevou ligeiramente até 39º,7, depois voltando ao normal. No dia 24 de Junho o macaco foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* no. 476. No dia 28 a temperatura se elevou a 40º,2 e no dia seguinte cahiu a 38º,7. O animal estando enfraquecido foi sacrificado. O exame histo-pathologico do figado revelou: "Infiltração gordurosa. Congestão. Discreta necrose das cellulas do figado e inclusões nucleares especificas" (TORRES).

Alem dos mosquitos usados nesta experiencia nós conservámos ainda 5 mosquitos que tinham sido infectados ao mesmo tempo que os demais no macaco 422. No dia 15 de Junho, com 26 dias de infecção, elles picaram o *rhesus* nº. 473 e depois foram emulsionados em agua esterilisada e injectados por via subcutanea nesse mesmo macaco.

EXPERIENCIA 4. *M. rhesus* no. 473. Picado e inoculado com mosquitos como anteriormente foi dito. Em 19 de Junho observa-se que a temperatura se eleva a 40º,5 e mantem-se assim durante dous dias. No dia 22 o macaco é encontrado morto na gaiola. Lesões macroscopicas typicas. O exame histo-pathologico do figado revela: "Necrose e degeneração gordurosa das cellulas do figado, inclusões nucleares. Congestão" (TORRES).

O sangue do *rhesus* nº. 473 do dia 19, inoculado no dia 21 de Junho no *rhesus* no. 455, produz infecção amarillica neste animal.

EXPERIENCIA 5. *M. rhesus* nº. 455. Inoculado como acima ficou dito no dia 21 de Junho. Apparece a primeira elevação de temperatura (40º,1) no dia 27. No dia 28 o macaco apresenta 38º,9 e no dia 29 35º,8. Foi sacrificado. Lesões macroscopicas typicas. O exame histologico revela: "Necrose e degeneração gordurosa das cellulas do figado e inclusões nucleares" (TORRES).

Embora, por qualquer das experiencias anteriores, não se possa responder ao assumpto em discussão, desejamos no emtanto chamar a attenção para os factos assignalados na experiencia 2 que consideramos como indicando que esse macaco estava infectado pelo sangue do animal que tinha sido injectado com os excreta dos mosquitos contaminados 5 dias antes. Nossas experiencias seguintes são absolutamente concludentes a esse respeito.

EXPERIENCIA 6. *M. rhesus* nº. 479. Este macaco recebeu em 25 de Junho por via subcutanea uma diluição de excreta de mosquitos que 5 dias antes tinham sido infectados no *rhesus* n. 476. Temperatura 38º,9. No dia 29 de junho, temperatura de 40º. Deste dia a 4 de Julho a temperatura

esteve sempre proxima a 40°,5. No dia 4 de Julho cahiu a 38°,7 e no dia seguinte o animal foi eecontrado morto na gaiola. Lesões macroscopicas typicas e o exame microscopico deu o seguinte resultado: "Congestão, degeneração gordurosa e necrose das cellulas do figado. Inclusões nucleares especificas" (TORRES).

EXPERIENCIA 7. *M. rhesus*. nº. 489. Foi inoculado em 29 de Junho com 1cc. de sangue do *rhesus* nº. 479, colhido nos dias 29 e 30 de Junho. Temperatura 39°,3. Este macaco teve uma infecção apyretica, como ás vezes acontece e no dia 6 de Julho foi encontrado cahido na gaiola e com 35°, sendo por isso sacrificado. Apresentava lesões macroscopicas e o figado, revelou ao exame histo-pathologico: "Congestão, degeneração gordurosa necrose das cellulas e muitas cellulas com inclusões nucleares" (TORRES).

EXPERIENCIA 8. *M. rhesus* no. 456. Foi inoculado no dia 8 de Junho com uma diluição de excreta de 2 mosquitos que tinham picado em 1º de Junho o *rhesus* nº. 445. A temperatura deste macaco não foi typica de febre amarella. Do dia 10 em deante a temperatura foi em geral alta sem modificação especial. Em 23 de Junho era de 40°. No dia seguinte baixou a 39°,5. Neste dia o macaco foi inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* no. 476. No dia seguinte o macaco parecia muito doente e nós o matámos. Lesões macroscopicas typicas e o exame histo-pathologico revelou: "Necrose extensa e degeneração gordurosa das cellulas do figado, inclusões nucleares abundantes, congestão e agglomerações de leucocytos polymorphonucleares" (TORRES).

Certamente estas lesões já estavam formadas antes da inoculação do material infectante do *rhesus* nº. 476.

Os 2 mosquitos desta experiencia, que ainda estavam vivos 13 dias mais tarde, foram mortos e triturados em agua esterilisada. A emulsão delles foi inoculada em um *rhesus* nº. 469, que tambem foi antes picado pelos mesmos 2 mosquitos.

EXPERIENCIA 9. *M. rhesus* no. 469. Este macaco foi inoculado como anteriormente ficou dito no dia 14 de Junho. Do dia seguinte em diante a temperatura se elevou a 40° e a 18 attingio 41°,1. No dia seguinte pela manhã a temperatura havia cahido consideravelmente sendo então o macaco sacrificado. Lesões macroscopicas typicas e o exame histo-pathologico revelou: "Necrose intensa e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas, inclusões intranucleares" (TORRES).

As experiencias acima demonstram que é possivel obter-se a infecção do *rhesus* com excreta de mosquitos tendo picado sómente 7 e até mesmo 5 dias antes. Ellas ainda uma vez confirmam o modo de contaminação pelos excreta e, considerando as experiencias de transmissão pela simples deposição de excreta sobre a pelle, mostram que talvez esse processo se possa egualmente produzir com mosquitos mais recentemente infectados.

About the time required by the infected Stegomyia to expell virulent excreta (1)

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A. da COSTA LIMA

Having shown the infeetious nature of the excreta of mosquitoes already infective by its bites, it remained to inquire whether such action would also be observed by using excreta of mosquitoes, that had bitten a yellow fever monkey, before attaining the 9th day after contamination, viz. the period considered by the authors as a minimum for the bites to become infective.

Accordingly we have undertaken some experiments in order to obtain data regarding the infection before that period. Though, by these experiments, we are not yet able to inform exactly in which day after the contamination the mosquito faeces become infective, they so far prove that the yellow fever virus may be present in the excreta at least 5 days after the mosquito has fed on an infected monkey. This we observed in two experiments and also verified in another case the infection produced by excreta of mosquitoes that had 7 days previously bitten an infected monkey. We give now brief notes of these experiments and of others performed in order to confirm the results we obtained.

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* nº. 434. Temperature 39º. Received on May 25 a subcutaneous injection of a dilution of excreta of 6 mosquitoes that had been fed 5 days previously on blood of the infected *rhesus* nº. 422, when the temperature of which hade risen above 40º. In order to use fresh excreta at the time of the experiment the mosquitoes were then fed on a guinea-pig.

On the 4 following days the temperature remained normal. On May 30 it had risen to 39º.9, falling the next day to 38º.8. The monkey was then bled and its blood inoculated, on May 31, in *rhesus* nº. 447. From that date forward the temperature has fluctuated, either a little above or a little bellow 39º. On June 12 we injected the monkey subcutaneously with 0.5 cc. of blood taken from infected *rhesus* 464; the temperature of that monkey was then 39º.9. Six days latter we observed a more marked rise of fever (40º), the temperature falling to normal on the following days. On June 29 we reinoculated the monkey with 1 cc. of blood taken from infected *rhesus* nº. 480. The first rise of temperature was observed on July 4 (40º.1). On the next day the temperature was 40º.9; on 6th—40º.5; on 7th — 40º. On 8th, at 11 a. m., it was killed.

The histo-pathological examination of the liver revealed: "Extensive fatty degeneration and necrosis of liver cells. Nuclear inclusions" (TORRES).

The reported experiment does not prove that the monkey was infected before the inoculations of blood. We believe, however, that there is

(1) Received for publication July 20, 1929.

some reason to suppose the occurence of a mild infection after the inoculation of excreta. In fact, the result which we have obtained in the next experiment seems to confirm that suspicion.

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* no. 447. Temperature 38o.7. Injected subcutaneously, on May 31st, with 0.5 cc. of blood withdrawn from *rhesus* no. 434. This monkey showed a rise of temperature only on June 5 (39o.8). From this day until the 12th there were slight fluctuations between 39o and 39o.5. On June 13 the temperature rose again to 39o.9; on the 14th to 40o.8. From this day until Jnne 21 we observed always temperatures over 39o: 15th: 39o.9; 16th: 40o.5; 17th: 39o.9; 18th: 48o.2; 19th: 39o.9; 20th: 40o; 21st: 39o.4. On this last day the monkey was inoculated subcutaneously with 0.5 cc. of blood of the infected monkey 476, without showing any reaction.

The case seems to be also of a mild character, though somewhat more severe than that of *rhesus* no. 434.

We also tried to prove the infective action of the mosquitoes used in experiment 1 by inoculating, on June 8, *rhesus* no. 457 with an emulsion of the bodies of 3 of the surviving insects, 19 days after they had been contaminated.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* no. 457. Inoculated, as above described, on June 8. This monkey did not show any marked rise of temperature, Therefore, on June 14, viz. on the sixth day after inoculation, the temperature dropped to 37o.8 early in the morning, but on the afternoon it had risen to 38o.5. The subsequent course was passed without marked accidents, although it had occured a slight rise of temperature (39o.7) on the 21st. On the 24th the monkey was injected subcutaneously with 5 cc. of blood withdrawn from the infected monkey 476. On the 28th the temperature rose to 40o.2 and on the next day had sunk to 38o.7. The monkey was then killed. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Fatty infiltration. Congestion. The fatty degeneration and the necrosis of liver cells are slight. Specific nuclear inclusions" (TORRES).

Besides the mosquitoes used in experiment 1 we have kept 5 specimens, also fed, at the same time, on infected monkey 422. These especimens were killed on June 15, viz. 26 days they had been contaminated and triturated in sterilized water. A few cc. of the emulsion thus prepared were injected subcutaneously into *rhesus* 473.

This monkey was previously bitten by the same mosquitoes.

EXPERIMENT 4. *M. rhesus* no. 473. Inoculated, on June 15, as above described. The first rise of temperature was observed on June 19 (40o.5) and it continued high on the two following days. On the 22nd, early in the morning, we found the monkey dead in its cage. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Necrosis and fatty degeneration of liver cells. Nuclear inclusions. Congestion" (TORRES).

The blood of *rhesus* 473, withdrawn on June 19 and inoculated on June 21 into *rhesus* 455, reproduced the yellow fever lesions in this monkey.

EXPERIMENT 5. *M. rhesus* no. 455. Inoculated, on June 21, as above described. The first rise of temperature (40o.1) was observed on June 27; on the 28th—38o.9; on the 29th—35o.8, in the morning, when the monkey was killed. The histo-pathological lesions of the liver observed by Dr.

TORRES were: "Necrosis and fatty degeneration of liver cells. Specific nuclear inclusions".

If by an examination of the foregoing cases we cannot draw a sure conclusion to answer to the question here discussed, therefore, by recording them, we desire to invite special attention on the facts reported in experiment 2, which we consider as indicating the monkey was infected by the blood taken from the animal that was injected with excreta of mosquitoes contaminated 5 days previously. However, our following experiment was undoubtedly conclusive on this point of view.

EXPERIMENT 6. *M. rhesus* nº. 479. Received on June 25 subcutaneously a dilution of excreta of two mosquitoes that had been contaminat ed on *rhesus* no. 476, 5 days previously. Temperature 38º.9. On June 29th: 40º. From this day until July 3 the temperature was high, near 40º.5 On the 4th July, it dropped to 38º.7. On the following day (5th) the monkey was found dead in the cage. The histo-pathological examination of the liver showed: "Congestion. Fatty degeneration and necrosis of liver cells. Specific nuclear inclusions" (TORRES).

EXPERIMENT 7. *M. rhesus* nº. 489. Inoculated on July 1 with 1 cc. of blood withdrawn from *rhesus* nº. 479 on the 29th and 30th June. Temperature 39º.3. This monkey did not show any rise of temperature, but on July 6, as the temperature had fallen to 35º, it was killed. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Congestion. Fatty degeneration and numerous liver cells with nuclear inclusions" (TORRES).

We have tried also to infect *M. rhesus* by using mosquitoes that had been contaminated by feeding on infected monkey 7 days previously.

The possibility of that infection seems to have been determined by the following experiment.

EXPERIMENT 8. *M. rhesus* nº. 456. Was inoculated subcutaneously on June 8 with a dilution of excreta of 2 mosquitoes that had been fed on infected *rhesus* nº. 445, on June 1. The temperature record of this monkey was not of a typical case of yellow fever. From June 10 the temperature was high, almost without any marked change. On June 23 it was 40º. On the next day, on the afternoon, it was 39º.5. We then inoculated 0.5 cc. of blood withdrawn from infected *rhesus* nº. 476. On the next morning (June 25), as the monkey looked very weak, we killed it. The histo-pathological examination of the liver revealed: "Extensive necrosis and fatty degeneration of liver cells; nuclear inclusions very abundant. Congestion. Agglomeration of polymopho-nucleated leucocytes" (TORRES).

Certainly these lesions were produced before the inoculation of the infective blood.

The 2 mosquitoes used in the foregoing experiment were kept and 13 days later killed and triturated in sterilized water. This emulsion was injected subcutaneously into *rhesus* nº. 469. This monkey was also bitten by the same mosquitoes.

EXPERIMENT 9. *M. rhesus* no. 469. On June 14 was bitten and received 2 cc. of the emulsion of the 2 mosquitoes used in experiment 8. The height of the febrile paroxym was reached on the 18th, when the temperature was 41º.1. The monkey was killed in the 20th, in the morning, when the temperature was very low. The histo-pathological examination of

the liver showed: "Intense necrosis and fatty degeneration of liver cells. Specific nuclear inclusions" (TORRES).

As we have, for the first time, recorded cases in which yellow fever in *M. rhesus* followed the inoculation of infective excreta of mosquitoes contaminated 7 or even 5 days previously, and considering our previous verification of infection produced by contact of infective excreta with the uninjured skin, we believe that the observations here reported ought to call renewed attention not only to the mode of infection in general, but specially to the result that may follow the contamination of the skin by excreta of mosquitoes more recently infected.

Contribuição ao estudo experimental da physiologia pathologica do "mal de engasgo" (1)

Pelo Dr. MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA.

Têm sido observados no Brasil, e especialmente em certas zonas ruraes, casos bastante numerosos de uma infecção caracterisada por perturbações mais ou menos profundas das funcções de deglutição. Estre as varias denominações por que se designa o quadro morbido prevaleceu a de "mal de engasgo".

O mal de engasgo foi, entre nós, objecto de numerosos estudos, esparsos sob a fórma de eommunicações a sociedades scientificas ou artigos de revistas medicas. Esses estudos se acham actualmente expostos de um modo bastante minucioso na these de doutoramento de S. Paulo do Dr. PARISI (2). Nós nos dispensamos pois, de qualquer historico e não nos estenderemos na descripção clinica.

Desde o inicio, a attenção dos clinicos se fixou nas alterações das funcções do esophago apresentadas pelos doentes e logo que foi possivel applicar ao exame desse orgão os methodos mais fecundos da investigação como o exame radiologico, os dados obtidos se tornaram muito mais precisos. O mal de engasgo se caracterisa radiologicamente por uma dilatação mais ou menos extensa e accentuada do esophago. Em muitos casos ha a formação nitida de uma bolsa onde ficam os alimentos, que não descem immediatamente para o estomago, ahi estacionando por algum tempo.

O catheterismo mostra que em varios casos não ha uma resistencia notavel do cardia á passagem dos alimentos, pois que sondas volumosas podem atravessar sem difficuldade a região do cardia e penetrar no estomago. Frequentemente os alimentos são regeitados totalmente ou em parte. Phenomenos de compressão, phenomenos á distancia e um estado de desnutrição que pode ir até á miseria physiologica e mesmo á morte completam o quadro clinico.

A pathogenia do mal de engasgo deu logar a muitas controversias. Muitos dos pesquizadores brasileiros que o estudaram procuraram estabelecer um nexo entre essa affecção e uma ou outra das doenças endemicas que mais ou menos intensamente existem no interior do Brasil (paludismo, doença de CHAGAS, etc.). Entretanto, os argumentos apresentados a favor de uma relação de causa a effeito entre uma dessas doenças e o mal de engasgo não foram até hoje de todo convincentes. A coexistencia do mal de engasgo e de uma dessas molestias parece ser simplesmente uma concomitancia nos mesmos individuos de doenças differentes.

(1) Communicação feita ao III. Congresso Brasileiro de Neurologia e Psychiatria. Julho de 1929.

(2) R. PARISI — Contribuição ao estudo do mal de engasgo e seu tratamento cirurgico. These de S. Paulo. 1925.

Não nos demoramos sobre as outras interpretações apresentadas (fechamento do esophago com consequente obliteração por acção do diaphragma, influencia da má alimentação, etc.). A nossa attenção foi exclusivamente voltada para o seguinte problema: seria possivel reproduzir experimentalmente em animaes um quadro morbido semelhante ao que caracterisa o mal de engasgo? Se positiva a solução desse problema, as vantagens para o estudo da physiologia pathologica dessa doença seriam evidentes.

Dadas as relações do esophago com os nervos pneumogastricos e conhecidos os resultados obtidos pelos physiologistas em experiencias sobre as alterações do tonus e do peristaltismo esophageano depois das secções desses nervos, a attenção de certos clinicos se voltou para esse lado. Uma observação celebre de KRAUS revelou em um caso de dilatação do esophago alterações accentuadas dos nervos pneumogastricos. O nervo esquerdo mostrava-se achatado com um desenvolvimento anormal de tecido conjunctivo vascularisado. Ao exame microscopico foi verificado estarem as fibras nervosas degeneradas em sua maioria, havendo apenas conservação de um pequeno numero em estado normal. O vago direito apresentava alterações do mesmo genero, comquanto menos accentuadas. A essas observações de KRAUS seguiram-se outras de HEYROWSKY, KELLING, GLAS, GERIMANOWITSCH, FRICKER, etc. D'ahi a idéa de procurar reproduzir experimentalmente a dilatação do esophago por secções dos pneumogastricos, operadas em niveis differentes. Essas experiencias, feitas por SINNHUBER, STARCK e outros deram resultados contradictorios. Entretanto HOFER em um trabalho longo e paciente chegou a resultados interessantes. PARISI transcreve em sua these as principaes experiencias de HOFER das quaes poude o auctor tirar, entre outras, as seguintes conclusões:

"1o. O nervo vago é, como se sabia, o nervo tonificante do esophago; sua resecção produz atonia de modo que desapparece a principio a peristaltica normal e que o obstaculo do cardia se torna insuperavel. Sua irritação faradica augmenta o tonus do esophago e, ao que parece, tambem a occlusão do cardia.

3o. A vagotomia, sob condições, produz similar absoluto á dilatação do esophago humano com cardioespasmo; com isto não queremos dizer que sómente uma affecção do vago pode produzir tal quadro morbido".

Resolvemos operar a vagotomia dupla em cães, conservando-os o mais tempo possivel, afim de poder formar opinião sobre este ponto tão controvertido. Nossas experiencias nos levaram á convicção de que a vagotomia dupla e total, comquanto fornecendo resultados interessantes, não permitte conclusões definitivas. Em primeiro logar, na quasi totalidade dos casos a sobrevida é reduzida (3). Por outro lado, as alterações profundas que se observam para o lado de outras funcções (circulação, respiração)

(3) Sabe-se que com precauções muito especiaes pode-se, em um ou outro caso, obter animaes que sobrevivam longamente á vagotomia dupla (PAVLOV e KATSCHKOWSKI, NIKOLAIDES, etc.). Essas experiencias são, porem, feitas em condições que prejudicam a boa observação das funcções do esophago, e alem disso, pela raridade dos resultados positivos, não podem servir de base para um methodo geral de pesquiza nesta questão.

difficultam a observação. Em nossas experiencias, os animaes, cuja sobrevida foi de poucos dias, recusavam o mais das vezes toda e qualquer alimentação. Foi-nos possivel, porem, verificar que o esophago se mostrava quasi completamente atonico. Em alguns casos, por occasião de esforços musculares violentos (movimentos de defesa ao serem seguros para a fixação na mesa de operações) os animaes mostravam periodos de extrema difficuldade respiratoria devida a uma compressão da trachéa pela bolsa esophageana dilatada e cheia de ar deglutido. Em um momento dado, se o ar contido na bolsa esophageana era expellido, o que se fazia com ruidos caracteristicos, a respiração se tornava livre e facil, mostrando apenas o rythmo lento e profundo, mas não dyspneico, geralmente observado nos cães vagotomisados. Todos os animaes eram tracheotomisados para evitar a penetração de particulas alimentares nas vias respiratorias. Em um caso houve accumulo de secreções mucosas na canula tracheal formando um obstaculo mechanico á respiração. Removido esse obstaculo, a respiração voltou ao seu typo habitual. Em todos os casos os animaes foram encontrados mortos, apresentando phenomenos de congestão e ás vezes edema para o lado dos pulmões, e uma grande bolsa esophageana dilatada por massa consideravel de ar.

O exame radiologico de um de nossos cães vagotomisados, não deu resultados muito animadores. Recusando-se o animal a comer o repasto de prova, procurou-se introduzir uma sonda no esophago. A operação não foi facil, pois essa quasi sempre se dirigia para a trachéa. Quando a sonda penetrou no esophago e se fez a introducção da pasta de bismutho, o animal teve uma syncope respiratoria, o que não permittiu continuar as observações.

Em resumo, comquanto fornecendo alguns resultados interessantes relativos á atonia e á ausencia de peristaltismo do esophago e aos phenomenos brutaes que dahi podem resultar (principalmente asphyxia ou dyspnéa por compressão da trachéa pela bolsa esophageana) na vagotomia dupla total as condições geraes do animal não são favoraveis a uma boa observação. Não nos foi possivel obter um quadro que apresentasse uma analogia estreita com o quadro morbido do mal de engasgo humano. Apenas alguns elementos subsidiarios foram aproveitados.

Passámos então a estudar o modo de reagir do esophago em animaes normaes e em animaes vagotomisados, quando se procura dilatal-o por injecções volumosas de agua ou de ar. Uma sonda era introduzida no orgão, de modo que sua extremidade se abrisse a meio percurso entre o pharynge e o estomago. O esophago era libertado em toda sua porção cervical que ficava accessivel á observação directa. Com uma seringa metallica de 100 c.c. podia-se, pela extremidade livre da sonda, fazer as injecções. No animal com os pneumogastricos intactos essas injecções dão logar a uma serie de ondas de contracção peristaltica que conduzem immediatamente o liquido ou o gaz para o estomago. Essas ondas são rythmicas e se succedem com alguns segundos de intervallo. O esophago não se deixa dilatar. Terminada a injecção, elle se esvasia immediatamente. Elle se apresenta, pois, em um verdadeiro estado de tonus que, segundo PALUGYAY (4) tem sido pouco estudado pelos auctores.

(4) J. PALUGYAY :—Schlucken in Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. de Bethe, Bergmann, Embden, Ellinger, Bd. III, pg. 357.

Quando se cortavam os nervos pneumogastricos no pescoço, as reacções do esophago se apresentavam de todo mudadas. A' medida que o liquido era injectado, observavam-se as contracções rythmicas, mas limitadas exclusivamente á primeira porção da região cervical; essas ondas de contracção não se transmittiam ao resto do esophago, que, inerte e atonico, se deixava dilatar até formar uma bolsa alongada, comprimindo a trachéa e os orgãos visinhos. A agua e o ar ficavam em grande parte no esophago sem serem conduzidas para o estomago. Está hoje demonstrado em Physiologia (KRONECKER, SCHREIBER, v. ESPEZEL, KAHN) que a parte superior do esophago cervical no cão é innervada por um ramo que se destaca do pneumogastrico acima do ganglio nodoso. A secção feita no meio do pescoço poupa assim esse ramo. Isso explica porque a primeira porção do esophago apresentava ainda ondas de contracção em nossas experiencias.

Poder-se-hia perguntar como as excitações mechanicas de compressão exercidas pela agua ou pelo ar injectados na parte media do esophago produzem ondas reflexas de peristaltismo. Isso pareceria em desaccordo com os dados classicos (HOLMER). Mas KAHN poude desde 1906 provar que é possivel provocar o peristaltismo do esophago pela introducção de corpos directamente no seu interior. MELTZER poude dissociar dous mechanismos reflexos que provocam o peristaltismo esophageano. Ao lado do mechanismo anteriormente admittido existe outro consistindo na producção de cadeias de reflexos, produzidos pela distensão do orgão. Cada ponto excitado provoca um reflexo local. Segundo MELTZER, a um peristaltismo *primario* se deve accrescentar um peristaltismo *secundario*. A essas duas fórmas de peristaltismo ainda accrescentou outra CANNON, dependente das fibras musculares lisas do esophago.

As experiencias por nós executadas acima relatadas vieram assim pôr bem em evidencia o modo de se comportar do esophago, quando privado de sua innervação normal pelos nervos pneumogastricos.

O problema pathologico, entretanto, ainda apresentaria depois disso muitos pontos obscuros. Não se poderia pensar, como effeito, em admittir uma suppressão completa das funcções vagaes nos doentes de mal de engasgo ou nos doentes portadores de uma dilatação esophageana de qualquer natureza. Nós nos perguntámos então quaes seriam os effeitos de uma lesão parcial dos nervos pneumogastricos. Nessa altura chegou-nos ás mãos o trabalho de CHICHIO TAMYIA e SHIGERU SANO (5) que tendo empregado uma technica differente da nossa chegam entretanto em muitos pontos a resultados analogos. Cabendo a esses experimantadores a prioridade dos resultados, é justo que exponhamos aqui summariamente em primeiro logar as suas conclusões. TAMYIA e SANO fizeram injecções de arsenico em glycerina (0,005 e 0,01 ccm. de solução a 50 p. 100) na bainha do vago-sympathico de cães. Puderam pelas verificações histologicas posteriores demonstrar que os nervos assim tratados apresentam alterações

(5) TAMYIA, CHICHIO, und SHIGERU SANO :—Experimentelle Studien über den Oesophagus. V. Roentgenologische Untersuchungen der expertmentellen Schluckbeschwerde und der Dilatation des Oesophagus beim Hunde ; deren Vergleich mit indiopathischer Oesophagusdilatation und ihre Pathogenese. Zeitschr. f. d. ges. experim. Medizin 1928, LXI, 627—650.

parciaes, de degeneração e atrophia que se estendem por todo o nervo. Essas alterações concordam com as lesões encontradas nas autopsias dos casos de KRAUS e HEYROWSKY. A operação foi em certos casos praticada em um só dos troncos do vago, e em outros nos dois. Os resultados são muito demonstrativos. Nos casos de lesão de um só dos pneumogastricos, foram notadas perturbações da passagem do repasto de prova atravéz do cardia. Essas perturbações eram reduzidas e não duradouras. O tonus e o peristaltismo do esophago não apresentavam perturbações apreciaveis. Os auctores concluem que a innervação dupla do esophago não é physiologicamente necessaria. A falta da innervação de um lado não produz modificações permanentes como atonia e perturbação da motilidade das paredes do esophago, dilatação, alterações definitivas da passagem do cardia.

Nos casos em que se procedeu á operação dos dois lados os principaes factos observados foram os seguintes: "24—48 horas após a operação o peristaltismo das paredes do esophago nas partes thoracica e subphrenica regride consideravelmente. Ao contrario do que se observa na secção total dos vagos, não falta elle completamente. . . A dilatação do lumen se installa 24—48 horas depois da operação. Essa dilatação cresce com o tempo, e não se limita só á parte inferior do esophago thoracico, onde a estagnação dos alimentos a reforça, mas tambem se estende ás partes superiores e inferiores. . . A dilatação do lumen se propaga até junto ao cardia, o que contrasta com os factos clinicos de dilatação idiopathica, nos quaes a dilatação o mais das vezes termina acima do hiato esophageano, achando-se a parte sub-phrenica do esophago junto com o cardia mais ou menos espasmodicamente contrahida. . . O esophago dilatado mostra-se na autopsia como um sacco atonico e inerte, cujas dimensões são, comparadas com as do cão normal, no minimo duas vezes maiores. . ."

Em nossas experiencias seguimos uma technica differente da de TAMYIA e SANO. Operavamos a secção total de um pneumogastrico e alguns dias depois a secção parcial do outro. Para isso, tomando o tronco nervoso, separavamos metade ou tres quartos das fibras que compõem o nervo e as cortavamos. Os animaes assim operados, manifestavam ao fim de 24 ou 48 horas todos os symptomas do mal de engasgo. Daremos aqui resumido o protocollo de uma das experiencias.

Cão. Secção do pneumogastrico direito em 2 de Outubro de 1928. A 24 do mesmo mez secção de metade do vago esquerdo. A partir de 26 o animal mostrava todos os symptomas do mal de engasgo. Dada a refeição comia com avidez. Ao fim de pouco tempo, porem, parava e depois de manifestações de grande afflicção regeitava os alimentos. No dia 29 foi examinado aos raios X, com o auxilio competente do Dr. EVANDRO CHAGAS. Dada uma mistura de leite e cytobario, que o animal deglutiu bem, foi collocado em pé sobre as patas trazeiras no apparelho. O liquido passára bem e se achava no estomago. Deu-se-lhe então uma nova refeição composta de carne impregnada de cytobario. Comeu bem a principio; mas pouco depois parou mostrando os symptomas caracteristicos da *entalação*. O exame radiologico mostrou então que os pedaços de carne se achavam todos no esophago, sem terem passado para o estomago. Antes de se ter podido tirar uma chapa, regeitou todos os alimentos. Renovou-se o repas-

to, com quantidade menor de alimentos, que foram guardados sem regeição. Aos raios X verificou-se novamente a estagnação da massa alimentar no esophago. Esse cão morreu na noite de 11 para 12 de Dezembro de 1928, um mez e meio depois da operação do segundo pneumogastrico. Apezar da avidez que sempre mostrava para os alimentos, as perturbações da deglutição impediram uma nutrição sufficiente. Pouco a pouco foi emmagrecendo, tendo chegado aos limites da miseria physiologica. So um pouco de leite que conseguia deglutir o mantinha em vida.

Um outro cão operado da mesma maneira em 24 de Setembro apresentava desde 27 o quadro morbido do mal de engasgo. Nesse dia, trazido ao laboratorio começou a comer com avidez. Ao fim de pouco tempo manifestaram-se as difficuldades da deglutição. Fazia esforços visiveis para engulir lançando bruscamente a cabeça para a frente e mostrando bruscos abalos do abdomen. A afflicção cresceu. Latia, corria, andava para traz. Assim permaneceu por mais de meia hora, até que regeitou os alimentos. Devemos tambem assignalar antes do vomito, uma enorme dilatação do abdomen, dando a impressão de serem as visceras recalcadas por uma contracção permanente do diaphragma. Neste animal os symptomas não se mantiveram sempre com a mesma intensidade como no primeiro caso. Foram regredindo e o mesmo cão serviu posteriormente para uma experiencia de secção dupla dos pneumogastricos.

Em resumo, com a secção total de um pneumogastrico e parcial de outro, se obtem no cão, um quadro clinico cujas manifestações se superpõem exactamente ás do quadro apresentados pelos individuos affectados de mal de engasgo. Sem querer entrar nas hypotheses que poderiam ser feitas para orientar as novas pesquizas no terreno da Pathologia, pensamos que esses resultados podem ser uteis para a elucidação dos problemas suscitados pela pathogenia dessa doença.

Sobre os effeitos das variações da concentração osmotica do liquido de perfusão na technica de LAEWEN-TRENDELENBURG

Pelo Dr. ANTONIO AUGUSTO XAVIER

Em 31 de Outubro de 1928 apresentámos á Sociedade Brasileira de Biologia um trabalho em que se registavam alguns factos sobre a acção vaso-motora da agua distillada e das soluções hypo e hypertonicas de chloreto de sodio (1).

Usámos em nossas experiencias a preparação de LAEWEN-TRENDELENBURG (perfusão das patas posteriores da rã: canula affluente na aorta; canula effluente na veia abdominal). Como liquidos hypo e hypertonicos, empregámos soluções de chloreto de sodio de differentes concentrações (de 0,1 a 0,6 p. 100 para as soluções hypotonicas; de 1 a 7 p. 100 para as soluções hypertonicas).

Os nossos resultados foram os seguintes:

1) A agua distillada exerce sempre uma acção vaso-constrictora muito energica. 2) As soluções hypotonicas de chloreto de sodio determinam igualmente vaso-constricção, tanto mais nitida quanto mais baixa é a concentração osmotica da solução. 3) As soluções moderadamente e fortemente hypertonicas produzem uma vaso-dilatação bastante energica, mas muito curta, substituida progressivamente por uma vaso-constricção duradoura. 4) As soluções hypo e hypertonicas, cuja concentração é proxima da concentração isotonica, são indifferentes. 5) Após a perfusão de soluções fortemente hypertonicas, a preparação não torna mais á sua condição primitiva; entretanto as soluções moderadamente hypertonicas não produzem alterações definitivas. A agua distillada e as soluções hypotonicas, do mesmo modo, não determinam modificações irreversiveis.

FLATOW e MORIMOTO (2) verificaram tambem a acção da agua distillada e das soluções hypo e hypertonicas de chloreto de sodio, mas com technica differente e resultados tambem inteiramente differentes dos nossos. Esses auctores realisaram experiencias em cães, com um methodo proposto ha pouco tempo por SCHILF (3). Com esse methodo avalia-se o estado de dilatação ou de constricção dos capillares de um determinado territorio vascular pela quantidade de sangue que se escôa de uma veia efferente desse territorio. As substancias cuja acção se quer estudar são introduzidas

---

(1) A. A. XAVIER—Sur les éffets des variations de la concentration osmotique du liquide de perfusion dans la téchniqne de LAEWEN-TRENDELENBURG. Société Brésilienne de Biologie, Séance du 31 octobre 1928.

(2) E. FLATOW und M. MORIMOTO—Ueber den gefaesserweiternden Einfluss von kleinen Adrenalindosen, Wasser, hypotonischen Kochsalzloesungen sowie von Blut beim Hunde. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1928, 131, 152

(3) E. SCHILF—Ueber die Wirkung von Atropin und Histamin [nach vorhergehenden Atropingaben] auf die Gefaesse des Hundes. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1927, 126, 37.

directamente na arteria afferente. E' necessario tornar o sangue previamente incoagulavel.

Com o methodo de SCHILF, os auctores citados, experimentando em cães, obtiveram resultados inteiramente oppostos aos por nós obtidos experimentando em rãs, com o methodo classico de LAEWEN-TRENDELENBURG. Assim, segundo FLATOW e MORIMOTO, no cão, a agua distillada e as soluções hypotonicas de chloreto de sodio produzem uma vaso-dilatação; as soluções hypertonicas determinam uma pequena vaso-constricção seguida de vaso-dilatação.

O presente artigo visa referir um novo trabalho de FLATOW (4) agora em colaboração com OSAWA, ainda sobre essa mesma questão.

FLATOW e OSAWA, posteriormente a nós (5), mas evidentemente sem terem conhecimento de nossas pesquisas, experimentaram, como nós o haviamos feito, a acção da agua distillada e das soluções hypo e hypertonicas de chloreto de sodio, usando a preparação de LAEWEN-TRENDELENBURG. Os resultados de FLATOW e OSAWA são exactamente os mesmos que os já por nós obtidos. Diante desses novos resultados, que confirmam as nossas pesquisas, deixam de existir as divergencias já por nós assignaladas em nosso primeiro trabalho.

Instituto Oswaldo Cruz, 27 de Junho de 1929.

---

(4) E. FLATOW und J. OSAWA - Der Einfluss von Wasser auf die Blutgefaesse des Frosches. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1928, 140, 220

(5) FLATOW e OSAWA fizeram suas experiencias durante os mezes de Outubro e Novembro de 1928. Nosso trabalho foi apresentado e entregue para publicação á Sociedade Brasileira de Biologia em 31 de Outubro de 1928.

Ueber die Wirkung verschiedener osmotischer Konzentrationen der Durchstroemungsfluessigkeit unter Anwendung der LAEWEN-TRENDELENBURG'schen Methode.

Von Dr. med. ANTONIO AUGUSTO XAVIER

Am 31. Oktober 1928 hatten wir Gelegenheit, der brasilianischen biologischen Gesellschaft eine Arbeit vorzulegen, in welcher einige Tatsachen ueber die vasomotorische Wirkung des destillierten Wassers und der hypo—und hypertonischen Chlornatriumloesungen dargestellt wurden (1).

Wir haben bei unseren Versuchen das LAEWEN-TRENDELENBURG'sche Praeparat benuetzt. (Durchstroemung der Hinterbeine des Frosches: zufuehrende Kanuele in die Aorta, abfuehrende Kanuele in die Bauchvene). Als hypo—und hypertonische Fluessigkeiten wandten wir Chlornatriumloesungen verschiedener Konzentration an. (von 0,1 o/o bis 0,6 o/o fuer hypotonische, von 1 bis 7 o/o fuer hypertonische Loesungen).

Die von uns erzielten Resultate waren wie folgt :

1)—Das destillierte Wasser bewies immer eine sehr energische gefaessverengernde Wirkung. 2)—die hypotonische Chlornatriumloesungen loesten ebenfalls gefaessverengerung aus, und zwar um so deutlicher, je niedriger die osmotische Konzentration der Loesung ist. 3)—die maessig oder stark hypertonischen Loesungen bewirken eine ziemlich energische jedoch sehr kurze Gefaesserweiterung, die nach und nach durch eine dauernde Gefaessverengerung ersetzt wird. 4)—die hypo—und hypertonischen Loesungen, deren Konzentration sich der isotonischen Konzentration naehert, verhalten sich indifferent. 5)—nach Durchstroemung von stark hypertonischen Loesungen kehrt das Praeparat nicht mehr in seinen urspruenglichen Zustand zurueck; indessen rufen die maessig hypertonischen Loesungen keine endgueltigen Veraenderungen hervor. Das destillierte Wasser und die hypotonischen Loesungen loesten ebenfalls keine rueckla eufigen Veraenderungen aus.

FLATOW und MORIMOTO (2) untersuchten gleichfalls die Wirkung des destillierten Wassers und der hypo—und hypertonischen Chlornatriumloesungen, jedoch unter Befolgung eines verschiedenen Verfahrens und die Resultate waren ebenfalls voellig verschieden von den unserigen. Diese Forscher machten ihre Versuche an Hunden nach einer vor kurzen von SCHILF (3) vorgeschlagenen Methode.

---

(1) A. A. XAVIER—Sur les éffets des variations de la concentration osmotique du liquide de perfusion dans la téchniq ue de LAEWEN-TRENDELENBURG. Société Brésilienne de Biologie, Séance du 31 octobre 1928.

(2) E. FLATOW und M. MORIMOTO—Ueber den gefaesserweiternden Einfluss von kleinen Adrenalindosen, Wasser, hypotonischen Kochsalzloesungen sowie von Blut beim Hunde. Archiv f. Exper. Pathol u. Pharmakol., 1928, 131, 152.

(3) E. SCHILF—Ueber die Wirkung von Atrcpin und Histamin [nach vorhergehenden Atropingaben] auf die Gefaesse des Hundes. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1927, 126, 37.

Vermittels dieses Verfahrens wirde der Erweiterungs—oder Verengerungszustand der Kapillaren in einem bestimmten Gefaessbezirk abgeschaetzt nach der Blutmenge die aus eine abfuehrenden Vene dieses Bezirkes ausfliesst. Die Substanzen, deren Wirkung festgestellt werden soll, werden direckt in die zufuehrende Arterie eingefuehrt. Das Blut muss vorher ungerinnbar gemacht werden.

Mit dem SCHILF'schen Verfahren erzielten die genannten Forscher bei ihren Versuchen an Hunden Resultate, die den unserigen an Froeschen, nach der klassischen Methode von LAEWEN-TRENDELENBURG angestellten voellig entgegengesetzt waren. Nach FLATOW und MORIMOTO bewirkten beim Hunde das destillierte Wasser und die hypotonischen Chlornatriumloesungen Gefaesserweiterung; die hypertonischen Loesungen riefen eine kleine Gefaessverengerung mit darauffolgender Gefaesserweiterung hervor.

Die vorliegende Arbeit weist auf eine neue, diesmal in Gemeinschaft mit OSAWA bewerkstelligte Veroeffentlichung von FLATOW (4) ueber diese gleiche Frage hin.

FLATOW und OSAWA haben nach uns (5), jedoch offenbar ohne von unseren Versuchen Kenntnis zu haben, die Wirkung des destillierten Wassers und der hypo—und hypertonischen Chlornatriumloesungen erforscht, wobei sie, wie wir es getan, das LAEWEN-TRENDELENBURG'sche Praeparat benuetzten. Die von FLATOW und OSAWA erzielten Resultate sind genau die gleichen wie die unserigen.

Angesichts dieser neuen Erbebnisse, die unsere Versuche nur bestaetigen, haben die schon von uns in unserer ersten Arbeit hervorgehobenen Abweichungen ihre Existenzberechtigung verloren.

---

(4) E. FLATOW und J. OSAWA—Der Einfluss von Wasser auf die Blutgefaesse des Frosches. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., 1928, 140, 220.

(5) FLATOW und OSAWA haben ihre Versuche waehrend der Monate Oktober und November 1923 angestellt, waehrend unsere Arbeit am 31. Oktober 1928 der brasilianischen biologischen Gesellschaft vorgelegt wurde.

Acções phylacticas não especificas em relação aos venenos ophidicos (*)

TRATAMENTO AUXILIAR DOS ACCIDENTES OPHIDICOS

Pelo Dr. J. VELLARD.

HISTORICO

Antes do descobrimento da sorotherapia antivenenosa, numerosas tentativas haviam sido feitas para o tratamento das mordeduras de cobras, quer com substancias chamadas anti-toxicas, taes como o permanganato de potassio ou os alcalis, tidas como capazes de destruir o veneno no organismo, quer com medicamentos diversos destinados á combater os principaes symptomas determinados pelo veneno. Dentro destes medicamentos, varios ainda são empregados como tratamento auxiliar dos accidentes ophidicos. A strychnina é um dos mais conhecidos; a sparteina, a cafeina, a tropina, a adrenalina, o oleo camphorado são tambem muito aconselhados, e o proprio alcool tem sempre numerosos partidarios. Estes differentes medicamentos eram, até agora, considerados como puramente symptomaticos, ajudando a combater a paralysia ou a sustentar o organismo.

Trabalhos recentes vieram mostrar a possibilidade de uma interpretação quanto á sua acção nos accidentes ophidicos. Já em 1894, ROUX tinha assignalado que o virus rabico e a toxina tetanica tornavam os animaes refractarios ao veneno da *vipera aspis*. M. PHISALIX retomou e desenvolveu estas pesquizas sobre a "immunidade" cruzada entre o veneno de vipera e o virus rabico, mostrando ainda, que este veneno, aquecido á uma temperatura conveniente, (75º) e tendo assim perdido a sua toxidez, mostra-se rabicido in vivo e in vitro; a injecção subcutanea ao coelho da mistura veneno aquecido + virus rabico é atoxica e confere uma immunidade solida e persistente em relação ao veneno e ao virus fixo; aquecido a 100, o veneno de vipera conserva as suas propriedades rabicidas, mas o seu poder antivenenoso desapparece. O veneno mucoso dos batrachios possue propriedades analogas, mostrando-se capaz de vaccinar os animaes contra a raiva experimental.

Estes factos foram, a principio, explicados como provenientes da uma acção para-especifica das antitoxinas formadas, susceptiveis de neutralizar, a um grao mais ou menos elevado, neurotoxinas differentes daquellas empregadas como antigeno na immunisação dos animaes. Observações posteriores vieram demonstrar a insufficiencia desta explicação. BILLARD, nos seus primeiros trabalhos a este respeito, fallava egualmente de "immunisação não especifica das neurotoxinas entre si"; tinha elle constatado entre

(*) Lido na IV. Conferencia Sul-Americana de Hygiene, Microbiologia e Pathologia, Rio, 4. VII. 1929.

outros factos que cobayas immunisados com toxina tetanica resistiam á injecção posteriora de doses certamente mortaes de toxina diphterica e de veneno de vipera; a immunisação com a toxina diphterica protegia contra o veneno de vipera, mas não contra a toxina tetanica; a immunisação com o veneno não tinha nenhuma protecção contra as duas outras toxinas. Porém, procurando explicar estes resultados, elle foi levado a verificar que não se trata de uma immunisação verdadeira, mas sim de uma protecção particular, que elle denominou "acção phylactica", protecção esta conferida pela injecção de uma substancia neurotoxica, antigenica ou não, em relação a outras substancias tendo as mesmas affinidades; a primeira injecção, impregnando e saturando os elementos sensiveis, não lhes permittiria mais, segundo esta theoria. fixar uma segunda substancia; assim é que o formol pode proteger contra as toxinas diphterica e tetanica, o veneno de vibora, a sparteina; a mesma sparteina permitte á cobaya de resistir a 10 D. m. m. de veneno de vibora, etc.

Algumas aguas mineraes mostraram propriedades analogas, porém, a sua acção é muito variavel segundo as fontes, cada uma dellas agindo especialmente sobre uma determinada substancia. É por um mecanismo semelhante que BILLARD explica ainda a inocuidade das anatoxinas formoladas, o formol impregnando muito rapidamente o nevraxe e tornando impossivel a fixação da toxina de penetração mais lenta. Esta theoria de BILLARD, bastante seductora á primeira vista, é porém susceptivel de muitas objecções. Resultados tão nitidos não foram aliás sempre obtidos; RAMON e ZOELHER, por exemplo, não lograram verificar resistencia particular em relação á toxina diphterica nas cobayas immunisadas com a antitoxina tetanica, discordancia esta que BILLARD attribue á acção do formol contido na anatoxina. Mas estes trabalhos chamaram a attenção para aquellas questões. Assim DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, TISSIER e LAFAILLE puderam proteger como fez BILLARD, cobayas contra uma dose mortal de toxina diphterica ou tetanica, empregando a sparteina; em relação á toxina tetanica, a strychnina mostrou-se pouco activa; a cocaina e o curare permaneceram inactivos. J. SCHUBERT verificou o poder antitoxico *in vitro* da cocaina, da morphina, da heroina sobre a toxina tetanica e a ricina, emquanto que a nicotina não é modificada por nenhuma substancia. Com a lobelina e a camphora, H. WADA não obteve nenhuma sobrevivencia nas cobayas que tinham recebido veneno de *Ancistrodon blomakoffi* (injecções separadas). PICADO não logrou proteger o coelho contra o veneno de *Naya* só com a sparteina, ao contrario do que se observa com o veneno de vibora, porém o animal sobreviveu com um tratamento mixto com sparteina (via venosa) e eosina associada á trypsina (localmente). RYUZO KATAGI neutralizou a acção curarisante do veneno de *tetrodon* sobre o musculo da rã com a guanidina, a strychnina, a cafeina, a camphora, a strophantina e a adrenalina. Varios corantes, o vermelho Congo, Azo-Wallblau, o azul de toluidina, o Diamiblau, permittiram a HANZLITO e BUTT proteger por injecção preparada (drogas na veia, toxina por via muscular) animaes coutra as toxinas botulinicas e diphtericas, e com mais difficuldade contra a toxina tetanica; obtiveram egualmente bons resultados com o veneno de *Naya*, porém, sómente por meio de injecções misturadas (veia); outras substancias ha que só agem após contacto.

E' interessante approximar estas pesquizas das de WALBUM sobre a metallotherapia, sobretudo na infecção tetanica experimental; a injecção de saes de Mn permittiu salvar camondongos que tinham recebido esporos virulentos de tetano; com doses convenientes de saes, WALBUM pude mesmo verificar que estes esporos ficam vivos por bastante tempo dentro do organismo; pouco a pouco, elles vão perdendo da sua virulencia, nunca apresentando porém os camondongos signaes de tetano.

Tentativas empiricas, tendo uma certa relação com estes estudos experimentaes actuaes, tinham sido feitas, ha já muito tempo, aliás sem resultado, para tratar certas affecções nervosas, mórmente a epilepsia, enxaquecas, nevralgias, pela injecção de venenos ophidicos. Uma crença popular, espalhada pela America do Sul, attribue mesmo á picada do *Crotalus terrificus* (cascavel) a propriedade de curar a lepra, d'ahi varios accidentes mortaes. Recentemente ainda, a Salamandrina, extrahida do veneno da *Salamandra terrestre,* foi proposta para curar a epilepsia (Stuchlik); um muito antigo remedio chinez para o tratamento da epilepsia e outras affecções nervosas, o *senso*, contém entre outros ingredientes, forte proporção de veneno de sapo.

PARTE EXPERIMENTAL

Para facilitar a relação das nossas pesquizas, nós sómente nos occuparemos, neste primeiro trabalho, dos venenos ophidicos; o estudo das differentes toxinas e do virus rabico será emprehendido num trabalho posterior.

Os venenos destinados a este estudo foram escolhidos com propriedades muito differentes uns dos outros: veneno de *Crotalus terrificus* LAUS ou cascavel; este veneno age no pombo sobretudo como veneno neurotoxico, paralysante; veneno de *Lachesis jararaca* WIED. (syn. de L. lanceolata dos autores brasileiros, nec de *L. lanceolata* LAC. da Martinique), essencialmente coagulante e proteolytico; enfim veneno de *Naya tripudians*, enviado pelo Haffkins Institute, de Bombaim, principalmente neurotoxico e anticoagulante. A pequena quantidade deste ultimo, á nossa disposição, não nos permittiu fazer ao seu respeito, um estudo tão completo quanto ao dos dous precedentes.

As substancias medicamentosas, em numero de doze, por nós estudadas, eram igualmente de natureza e acção mui diversa: *sulfato de sparteina, sulfato de strychnina, chlorhydrato de adrenalina, cafeina, chlorhydrato de morphina, sulfato de atropina, chlorhydrato de cocaina, chlorureto de manganez, hydrochlorato de pilocarpina, oleo camphorado, digitalina e alcool.*

TECHNICA

A technica empregada consistia em verificar a acção da substancia em estudo, sobre a intoxicação determinada pela injecção de uma ou varias doses mortaes de veneno. Afim de bem pôr em evidencia esta acção, realizamos com cada medicamento numerosas series de experiencias, fazendo variar os differentes factores que entravam em jogo: Via de introducção, intervallo entre as injecções, doses de veneno, doses de medicamentos. O animal de experiencia sempre foi o pombo, por ser muito sensivel aos venenos ophidicos.

Cada medicamento foi estudado de duas maneiras differentes: primeiro, depois do contacto *in vitro* com o veneno; depois em injecção separada, afim de evitar qualquer causa de erro, devida a uma alteração possivel do veneno pelo medicamento, analoga áquella verificada com o permanganato ou os alcalis. O tempo de contacto ou o intervallo entre as injecções variava em cada experiencia, segundo a seguinte disposição geral, susceptivel de modificações segundo os resultados obtidos:

Injecções misturadas:

1) Injecção de veneno + medicamento, misturados na seringue, sem ter sido deixados em previo contacto.
2) Injecção de veneno + medicamento, após 1 hora de contacto in vitro.

Injecções separadas:

3) Injecções das 2 soluções, em dous lugares differentes, no mesmo momento.
4) Injecção das duas soluções, em logares differentes, á 1 hora de intervallo; em uma primeira serie, o medicamento é injectado em primeiro logar, afim de verificar a sua acção preventiva; numa segunda serie, elle é injectado após o veneno, afim de verificar a sua acção curativa.

Nossas experiencias foram repetidas, tanto quanto foi possivel, por via venosa e por via muscular, com excepção de algumas substancias cuja toxidez, tal como a strychnina, ou a natureza, tal como a do oleo camphorado ou do alcool, impedia a sua introducção por via venosa.

Venenos—Afim de igualar as pequenas differenças individuaes de sensibilidade, que existem no pombo, embora sejam menos accentuadas que na cobaya, temos empregado como 1ª dose, uma dose um pouco mais forte que a D. m. m.; esta precaução é indispensavel, 10 a 15 o/o dos animaes escapando á morte ou apresentando uma sobrevivencia muito variavel com a D. m. m. limite. As doses minimas, *certamente mortaes*, verificadas com varias testemunhas para cada serie de experiencia com os 3 venenos estudados são os seguintes:

V. de *Cr. terrificus*: via venosa: 0,002 mg. (morte entre 2 e4 horas).
via muscular: 0,004 mg. (morte entre 10 e 15 horas).
V. de *L. jararaca*: via venosa: 0,10 mg. (morte entre 20 e 30 minutos); já com 0,06 mg., 60 o/o das testemunhas morrem; com 0,08 mg., alguns raros animaes sobrevivem.
via muscular 1 mg. (morte entre 8 e 12 horas).
V. de *N. trupudians*: via venosa, unica empregada: 0,10 mg. (morte em 40 e 60 minutos).

Estas pesquizas necessitam do emprego de varios animaes para cada experiencia. Com effeito não se trata, como na dosagem de um soro antitoxico, de verificar a acção directa do medicamento em estudo, sobre um veneno; pelo contrario, são estes elementos que vão agir, ambos separadamente, sobre o organismo vivo, nelle provocar reacções complicadas, e mo-

dificar a sua receptibilidade. Para afastar tanto quanto foi possivel as variações, cada experiencia foi repetida com 3 animaes no minimo, e mesmo com um numero maior, quando os primeiros resultados não concordavam entre si. E' com tal methodo de fiscalização que pudemos estabelecer os seguintes quadros (vide paginas 161 e 162) resumindo as nossas pesquizas propósito de cada medicamento estudado.

DISCUSSÃO

Os resultados resumidos nestes quadros levam a um certo numero de considerações interessantes.

Varios dos medicamentos experimentados, mostraram accentuada acção protectora, uma "acção phylactica" para empregar a expressão de BILLARD, em relação aos venenos ophidicos, permittindo aos animaes supportar sem accidentes graves a injecção posteriora de uma dose certamente mortal de veneno. Esta acção foi muito mais notavel sobre os venenos neurotoxicos de *C. terrificus* e de *N. tripudians* que sobre o de *L. jararaca*, pobre em neurotoxinas, e cuja acção local não foi modificada. Em condições experimentaes identicas, sómente tres medicamentos, a strychnina, a adrenalina, a cafeina, lograram proteger contra o ultimo veneno; emquanto que seis, a sparteina, a adrenalina, a cafeina, a atropina, a pilocarpina e o chloreto de Mn, mostraram-se activos com o veneno de *N. tripudians*; cinco evitaram a morte (sparteina e adrenalina), ou determinaram uma grande sobrevivencia (morphina, pilocarpina e chlorureto de Mn) com o de *C. terrificus*, e outros tres retardaram ligeiramente a evolução dos accidentes (strychnina, cafeina, cocaina).

A acção dos diversos medicamentos não se manifestou da mesma maneira em relação a cada um destes venenos; sómente a adrenalina protegeu contra os tres; a sparteina permittiu salvar animaes com os venenos de *C. terrificus* e de *N. tripudians*, porém mostrou-se completamente inactiva em relação aquelle de *L. jararaca*; a strychnina, pelo contrario, protegeu bem contra o ultimo veneno, mas nada fez contra o veneno de *N. tripudians* e retardou ligeiramente a morte com aquelle de *C. terrificus*. A morphina, bastante activa contra o veneno de *C. terrificus*, é desprovida de acção quanto aos dous outros.

Não menos differentes são as condições nas quaes actuam esses diversos medicamentos. Assim a sparteina possue mais accentuado poder protector, quando injectada uma hora antes do veneno, outros, pelo contrario, taes como a adrenalina e a morphina, mostraram-se mais efficazes quando injectados no mesmo tempo ou alguns minutos sómente antes ou depois do veneno. Applicados mais tardiamente, após o apparecimento dos primeiros symptomas da intoxicação ophidica, nenhum delles mostrou-se activo.

A via de introducção dos medicamentos tem tambem grande importancia; a mesma dose de cafeina, por exemplo, injectada uma hora antes do veneno de *L. jararaca*, protege sómente por via muscular, a sua eliminação sendo rapida demais por via venosa.

Em nenhum caso, os symptomas determinados pelos medicamentos, strychnina, sparteina, etc. . . foram modificados pela injecção dos venenos.

QUADRO I.—Injecções separadas. Medicamento v. muscular 1 hora antes do veneno (v. venosa).

MEDICAMENTO	Veneno de *C. terrificus* 0,002 mg.			Veneno de *L. jararaca* 0,10 mg.			Veneno de *N. tripudians* 0,10 mg.			OBSERVAÇÕES
	Protecção completa	Protecção ligeira	Protecção nulla	Pretecção completa	Protecção ligeira	Protecção nulla	Protecção completa	Protecção ligeira	Protecção nulla	
Sparteina: 15 mgs.	0					† 17'	s			Testemunhas: 0,002 mg. v. C. t. via venosa. † 2-4 horas
Strychnina: 0,4 mg.		† 5-6 horas		0					† 50'	0,10 v. L. j. via venosa, † em menos de 1 hora
Adrenalina: 0,5 mg.	s			0			0			
Cafeina: 20 mgs.		† 5-6 horas		0			0			0,10 mg. v. N. t. via venosa. † 40'-60'
Morphina: 20 mgs.		† 24 horas				† 13'			† 90'	
Atropina: 20 mgs.			† 2h. 30'			† 22'	S. R.			
Cocaina: 5 mgs.		† 5-6 horas				† 10'			† 95'	
Pilocarpina: 20 mgs.		† 12 horas				† 50'	0			
Digitalina: 10 mgs.			† 4 horas			† 50'		† 120'		
Oleo camphorado: 0,5 cc.			† 3 horas			† 30'			† 55'	
Alcool: 5 cc.			† 3 horas			† 16'			† 90'	
Chlorureto de Mn: 10 mgs.		† 8 horas				† 25'	0			

Abreviações: 0=nenhum symptoma — s=symptomas leves — S=symptomas graves — p=paresia — P=paralysia — R=restabelecimento — †=morte.

QUADRO II.—Injecções mixtas.

MEDICAMENTO	Veneno de *C. terrificus*				Veneno de *L. jararaca*				OBSERVAÇÕES
	Sem contacto previo		1 hora de contacto in vitro		Sem contacto previo		1 hora de contacto in vitro		
	V. venosa	V. muscular	V. venosa	V. muscular	V. venosa	V. muscular	V. venosa	V. muscular	
Sparteina: 15 mgs.	—	0,005=0 0,010=P. R.	—	—	—	1 mg. † 6 h.	—	1 mg. S. R.	Testemunhas: V. *C. terrificus*.
Sparteina: 10 mgs.	—	0,005=0 0,010=† 22 h.	—	—	—	—	—	—	0,002 v. venosa=† 2-4 horas.
Strychnina: 0,4 mg.	—	0,005=† 36 h.	—	0,005=† 36 h.	—	—	—	1 mg. † 12 h.	
Adrenalina: 0,1 mg.	0,002=† 160'	—	—	—	0,10=0 0,15=† 21 h.	—	0,20=S. R. 0,30=† 3'	—	0,004 v. venosa=† 2 horas.
Adrenalina: 0,5 mg.	—	0,005=0 0,008=† 10 h.	—	0,008=† 21 h.	—	1 mg. † 10 h.	—	—	0,004 v. musc. =† 10-15 horas.
Cafeina: 20 mgs.	0,002=† 14 h.	0,005=p. R. 0,010=† 18 h.	—	0,005=p. R.	0,10=s. R. 0,15=† 8'	—	0,15=† 7'	—	0,005 v. musc. =† 10-15 horas.
Morphina: 20 mgs.	0,002=P. R.	0,005=0 0,008=† 36 h.	0,02 P. R.	—	0,10=† 11'	—	0,10=† 20'	—	0,010 v. musc. =† 5-7 horas.
Atropina: 20 mgs.	—	0,005=0 0,010=† 5 h.	—	0,010=† 5 h.	—	—	—	—	Veneno da *L. jararaca*
Atropina: 10 mgs.	0,002=0	—	—	—	0,10=0 0,15=† 4 h.	—	—	—	
Cocaina: 5 mgs.	—	0,005=P. R.	—	0,005=P. R.	—	—	—	1 mg.=† 12 h.	
Digitalina: 20 mgs	—	0,005=† 3 h.	—	0,005=† 2 h. 50'	—	—	—	1 mg.=† 10 h.	0,10 mg. v. venosa=† em menos de 1 hora
O. camphorado: 0,5 cc.	—	0,005=0 0,008=† 14 h.	—	0,008=† 14 h.	—	—	—	1 mg. † 12 h.	
Chloreto de Mn: 2 mgs.	0,002=† 6 h. 0,003=† 90'	—	0,002=0 0,003=† 5 h	—	0,10=† 10'	—	0,10=0 0,15=† 4'	—	1 mg. v. musc. =† 8-12 horas.
Chloreto de Mn: 10 mgs.	—	—	—	—	—	—	—	—	

Mesmas abreviações que no quadro I.

A interpretação destes factos é difficil. Não se pode tratar de uma destruição do veneno pelo medicamento, analoga áquella exercida in vitro pelo MnO^4k ou os alcalis, pois esta acção protectora se dá egualmente in vivo, por injecções separadas.

Hypotheses diversas podem ser formuladas para explicar esta acção in vivo.

A primeira que se apresenta é de um antagonismo pharmacologico entre os venenos e os medicamentos estudados, cuja acção viria oppôr-se directamente áquella dos venenos ou augmentar a resistencia physiologica do organismo. Sobre esta hypothese repousava em grande parte o emprego da medicação symptomatica empregada nos accidentes ophidicos, por exemplo da strychnina e do oleo camphorado para combater os phenomenos paralyticos, e da adrenalina e da cafeina para sustentar o coração. O resultado da nossa experiencia não concorda com este modo de ver: assim a strychnina é pouco activa sobre os venenos paralysantes de *C. terrificus* e de *N. tripudians*, enquanto que a morphina mostrou, nas mesmas condições, acção nitida na intoxicação crotalica. As propriedades pharmacologicas da sparteina e da adrenalina tambem não permittem explicar por este mecanismo, o muito elevado poder protector destes dous medicamentos contra os venenos paralysantes. Enfim, esta acção antagonica deveria se exercer mesmo após o apparecimento dos primeiros symptomas da intoxicação ophidica, o que não se dá, pois estes medicamentos são mais ou menos desprovidos de acção curativa.

Uma acção indirecta sobre o organismo, quer retardando a absorpção, ou facilitando a eliminação rapida do veneno antes da sua fixação, quer estimulando diversas reacções naturaes de defeza, não parece-nós tambem trazer uma explicação satisfactoria dos factos observados. Medicamentos de acção opposta, como a atropina e a pilocarpina, mostraram-se ambos activos; pelo contrario a acção da digitalina é quasi nulla, emquanto que a cafeina possue grande poder protector contra os venenos de *C. terrificus* e de *N. tripudians*. Da mesma maneira, as nossas experiencias com a adrenalina, sobretudo em relação ao veneno de *L. jararaca*, não permittem attribuir ás propriedades vaso-constrictoras d'este medicamento a sua tão accentuada acção sobre os venenos estudados. Quanto á uma acção estimulante sobre as defesas do organismo, analoga áquella observada por WALBUM com a metallotherapia nas injecções tuberculosas e tetanicas, a rapidez de evolução dos accidentes ophidicos torna a sua importancia muito secundaria.

Para explicar a acção da sparteina sobre o veneno de vipera, BILLARD tinha imaginado, como já temos visto, outra hypothese mais interessante, avizinhando-se á certos pontos de vista, daquella já apresentada a proposito da acção anticurarisante de varias snbstancias taes como a adrenalina. Segundo esta theoria, a sparteina e o veneno possuiriam uma acção necrotica semelhante, e seriam ambos curarisantes; injectada a primeira, a sparteina impregnaria o nevraxe que tornar-se-ia durante todo o periodo desta impregnação, incapaz de fixar outras substancias; haveria assim, por parte da sparteina, uma protecção local não especifica "uma verdadeira vaccinação" do tecido nervoso. Esta theoria muito simples é seductora; ella permitte explicar commodamente como certos medicamentos, de acção

pharmacologica diametralmente opposta, taes como a strychnina e a morphina, a atropina e a pilocarpina exercem uma protecção analoga contra os venenos ophidicos. Ella não satisfez porém em relação a certas criticas. Assim BILLARD tinha pensado ser necessario pôr as suas cobayas em estado de mal sparteinico, afim de assegurar a sua protecção contra o veneno de vipera. Em nossas experiencias, temos observado que esta protecção existe no pombo, mesmo com doses de sparteina inferioras á dose toxica; não se trata pois de uma "impregnação" ou de uma saturação do nevraxe pela sparteina. Mais ainda esta acção protectora não é um phenomeno reversivel, como permittiria de suppôr esta hypothese, nenhum dos nossos venenos tendo se mostrado capaz de evitar ou mesmo de diminuir os symptomas de intoxicação determinados pelos medicamentos estudados.

Experiencias complementares, actualmente em realização, são necessarias para poder apreciar bem o valor da hypothese de BILLARD nestes phenomenos. Fóra esta acção protectora "in vivo" quasi todos os medicamentos estudados mostraram "in vitro", sobre os venenos, acção neutralizadora mais ou menos accentuada, augmentando ainda após certo tempo de contacto 15 mgs de sparteina, por exemplo, misturados no momento da injecção por via muscular com 1 mg de veneno oe *L. jararaca*, são incapazes de poupar a morte dos animaes, emquanto que estes escapam, si o veneno e a sparteina ficaram em contacto durante 1 hora. A strychnina parece desprovida de poder anti-toxico in vitro; este é, pelo contrario, muito accentuado com a adrenalina, da qual 0,1 mg protege, por via venosa, contra 0,2 mg de veneno de *L, jararaca* depois de 1 hora de contacto in vitro, e sómente contra 0,1 mg sem o contacto previo. Exceptuando-se o alcool que coagula as proteinas dos venenos, o oleo camphorado que contem acidos gordurosos podendo possuir uma acção neutralizadora propria, e o chloreto de Mn que determina nos venenos abundante floculação, nenhum dos outros medicamentos estudados, logrou determinar in vitro alteração apparente dos venenos, coagulação, floculação, precipitação etc.

Esta attenuação "in vitro" provem provavelmente de uma attenuação das toxinas ophidicas, analoga áquella já assignalada por varios autores com a adrenalina em relação ás toxinas diphtericas e tetanicas, e não sem alguma analogia com a acção do formol. Outra semelhança existe ainda entre a acção deste ultimo sobre os venenos e aquella dos medicamentos, agora estudadas: a facilidade relativa de attenuar as neurotoxinas dos venenos emquanto que a acção necrosante local do veneno de *L. jararaca* é muito pouco modificada.

CONCLUSÕES

Em nossas experiencias, as condições nas quaes se exerce a acção dos differentes medicamentos estudados, não são uniformes, variando pelo contrario não somente segundo os medicamentos, mas ainda com cada veneno.

Nenhuma das hypotheses que temos encarado parece capaz de explicar por si só o mecanismo de tal acção protectora. Nestes phenomenos, diversos factores devem intervir. Mas, de um modo geral, parece, porém, que os medicamentos neurotropos, quasquer sejam as suas propriedades particulares, agem pondo, durante um tempo variavel, o organismo num

estado de resistencia especial em frente ás neurotoxinas ophidicas, mas não em frente dos outros elementos dos venenos, cuja acção local não é modificada. Quanto ao mecanismo intimo desta protecção, nada podemos formular á não ser hypotheses; a de BILLARD, apezar do seu interesse, nos parece insufficiente. E' provavel que a acção das substancias neurotropas não se limite a uma simples protecção passiva, impedindo pela sua presença a fiscalisação de outras neurotoxinas, mas que ellas modificam de maneira mais ou menos duradoura, as condições de excitabilidade e sobretudo de conductibilidade dos elementos nervosos. Trataremos novamente desta questão mais tarde, quando estudarmos as acções phylacticas não especificas em relação ás toxinas microbianas e ao virus rabico.

Fóra este poder protector especial, de mecanismo escuro, cada medicamento, segundo as suas propriedades pharmacologicas especiaes, pode actuar de modo indirecto sobre a intoxicação ophidica, quer retardando a penetração do veneno ou facilitando a sua eliminação, quer mantendo as forças do organismo; uma verdadeira acção antagonica destes medicamentos sobre os venenos é, pelo contrario, muito pouco provavel.

Enfim, a maior parte destes medicamentos mostrou "in vitro" accentuada acção neutralizante em relação aos venenos estudados.

* * *

No ponto de vista pratico, estes resultados tem um certo interesse therapeutico. Mostram que nos accidentes ophidicos, o emprego, de diversas substancias neurotropas, accrescentadas ao tratamento pelos sôros como medicação auxiliar, longe do possuir inconvenientes, pode, pelo contrario, ajudar á combater de maneira util a intoxicação.

Experimentalmente, nenhum destes medicamentos mostrou, é verdade, acção curativa; porém, mesmo com sôros anti-ophipicos, o poder curativo, nos pequenos animaes de laboratorio, é difficilmente posto em evidencia, por causa da rapidez, nestes animaes, da intoxicação ophidica. No homem, as condições são differentes e a evolução dos accidentes mais lenta.

A acção daquellas substancias, de penetração muito rapida, pode fazer-se sentir e contribuir a retardar a marcha da intoxicação, e no mesmo tempo manter as forças do organismo, segundo as suas differentes propriedades pharmacologicas.

Dentro de todos estes medicamentos auxiliares, o mais apontado é a sparteina; vem em seguida, a adrenalina. As indicações para a cafeina e a strychnina já são mais limitadas. Com venenos muito dolorosos, taes como os de aranhas ou de escorpiões, a morphina ás vezes, mesmo a cocaina, podem ser dadas sem perigo de aggravar os phenomenos paralyticos. A digitalina, pelo contrario, deve ser evitada. Enfim, o alcool, do qual se abusa tantas vezes nestes accidentes, não apresenta nenhuma vantagem para os doentes; administrado em dose alta em individuos não acostumados, já tem sido causa de accidentes graves.

O emprego destes medicamentos, em todo caso, não pode ser considerado senão como um complemento do tratamento sôrotherapico especifico.

O interesse principal, na nossa opinião, é de contribuir á protecção do organismo, emquanto se espera que a acção dos sôros, sempre bastante lenta, tenha o tempo de se manifestar.

SOMMAIRE

Dans l'intoxication expérimentale du pigeon avec les venins de *Crotalus terrificus*, de *Lachesis jararaca* et de *Naya tripudians*, nous avons étudié l'action de 12 médicaments, possédant des affinités neurotropes plus ou moins accusées, arrivant aux conclusions suivantes :

1—Quelques-uns des ces médicaments exercent une action protectrice spéciale contre ces venins, permettant, injectés une heure avant le vénin, d'eviter tout symptôme d'intoxication chez le pigeon. Certains n'agissent qu'injectés en même temps que le vénin. D'autres sont complètement inactifs. Aucun d'entre eux ne possède de propriétés curatives.

2—En plus de ce pouvoir protecteur, ou phylactique, un certain nombre d'entre eux possède sur les venins, une action neutralisante "in vitro", s'accentuant après une heure de contact.

3 - Les conditions dans lesquelles s'exercent ces deux actions, protectrice et neutralisante, sont très variables suivant les venins et les médicaments. Sur leur mécanisme très complexe, on ne peut actuellement formuler que des hypothèses.

4—Au point de vue pratique, certains de ces médicaments, surtout la spartéine et l'adrénaline, peuvent être utilisés avec avantage comme complément du traitement sérotérapique spécifique dans les accidents déterminés par les animaux venimeux.

PRINCIPAES AUTORES CITADOS

1—BILLARD—Immunité non spécifique des neurotoxines entre elles. *C. R. Biologie* 1926 - Pouvoir anagotoxique de certaines eaux minérales. *Ibid.* Juillet 1926—Pouvoir anagotoxique de quelques eaux minérales d'Auvergne. *Presse medicale.* 8 Janvier 1927—Phylaxie non spécifique et immunité spécifique. *C. R. Biologie.* Février 1927—Philaxie non spécifique. *Progrès médical.* 20 Mai 1927.

2—DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, TISSIER et LAFAILLE - Sur les effets des toxines diphtérique et tétanique chez les animaux soumis à l'action de certains poisons. *C. R. Biologie* 97. 1927.

3 - HAMZLITO a. BUTT—Prevention of toxin poisoning with colloidal dyes. *Journ. of pharm. a. exp. thes.* 33. 1928.

4 - HOUSSAY y NEGRETE —Nuevos estudios experimentales sobre la acción physiologica de las ponzoñas de las arañas. *Rev. del Inst. Bact. B. Ayres* 2. 1919.

5 - MARIE—Glandes surrénales et toxi-infections. *Zeits. f. Immf. Orig.* 17. 1913. 17.—Id. *An. Inst. Pasteur* 32. 1918.

6 - MOREIRA DA FONSECA (J)—Systema chromaffino. *These.* Rio de Janeiro 1913.

7—PANELLA citado por MOREIRA DA FONSECA.

8—M. PHISALIX—Animaux venimeux et venins. Paris 1922—Immunité naturelle des vipères et des couleuvres contre le venin des batraciens. . . *Journ. Physiologie et Pat. générales* Septembre 1909—Pouvoir rabicide in vitro du venin de vipère aspic. *C. R. Ac. des Sciences*: 186. 1928—Vaccination contre le venin de vipère et la rage expérimentale. . . Ibid. 187. 1928.

9—M. PHISALIX et F. PASTEUR—Les rayons ultraviolets détruisent le pouvoir rabicide du venin de la vipère aspic *C. R. Ac. Sciences.* 186. 1928.

10—PICADO—Traitement diastasiqne de l'envenimation cobraïque expérimentale. *C. R. Biologie.* 98. 1928.

11—RAIMUNDA J. M.—Contribuição para o estudo dos chamados segredos contra a mordedura das cobras peçonhentas. *Arg. indo-port. Med. Hist Nat.* 3. 1925.

12—RAMON et ZOELLER—Les acquisitions théoriques et pratiques dues à l'anatoxine diphtérique. *Paris Medical* Dec. 1926.

13—ROGERS—On the physiological action and antidotes of. . . venoms. *Proc. R. Soc.* 1903—A lecture of the physiological actions and antidotes of snake venoms. . . *Lancet* 1904.

14—ROUX—*Com. congrès Budapesth.* 1894.

15—RYUZO KATAGI—Der Einfluss einiger erregender Gifte auf die Wirkung des Tetrodontoxins an Skeletmuskel. *Ref. 2. f. ges. Phys. exp. Pharm.* 39. 1927.

16—SCHUBERT—Studien ueber Tetanustoxin, Ricin und einige Alkaloiden und ueber ihre Entgiftung. *Z. f. Immf. Orig.* 57. 1928.

17—SHARP, NEVILLE ALEX. DYCE. The treatment of Scorpion Sting. *Journ. of Trop. med. a. Hyg.* 27. 1924.

18—STUTZER—Ueber Wirkung von Adrenalin auf Bakterien und Diphteria—toxin. *Zeits. f. Immf. Orig.* 22.

19—STUCHLIK—Ueber die Behandlung der Epilepsie mit Salamandrin *Bratisl. Lakar* 6. 1927. (*Ref. Centralb. Bakt. Ref.* 89.

20—TROISE—Estudio farmacológico de la ponzoña del Latrodectus mactans. *Rev. Soc. Argentina Biol.* IV. 1928.

21—VANCE—Red Back Spider Bite. *Med. Journ. Australia.* I. 1922.

22—WADA, HEIMU—Experimental studies on treatment of bite of snakes (Anc. Homkoffi). *Japan. med. World.* 7. 1927.

23—WALBUM—Metallsalztherapie. *Zeitsch. f. Immf.* 43. 1925.—Ibid. 47 1926—Ibid. 49. 1927—Metallsalztherapie. Tetanus und Tuberkulose. *Zeits. f. Tuberkulose* 48. 1927—Metallsalztherapie und Metallsalzprophylaxie. Tuberkulose. *Zeits. f. Tuberkulose* 51. 1928.

DA HEREDO-INFECÇÃO NA TUBERCULOSE (1)

Pelo Dr. A. FONTES

Chefe de Serviço do Instituto Oswaldo Cruz

"Outro ponto muito importante a elucidar é o da herança tuberculosa; nada impede que a granulação se transmitta ao féto, attendendo as dimensões d'ella, que são compativeis com a passagem atravéz o filtro".

". . . . . poderá ser substituida senão inteiramente, pelo menos em grande parte dos casos a *noção de terreno tuberculisavel pela de tuberculose em potencial*".

A. FONTES (1910)
Mem. do Inst. Osw. Cruz (1)

Devemos entender por heredo-infecção na tuberculose a transmissão do virus tuberculoso da mãe ao feto, através da placenta, com integridade do tecido placentario.

É, pois, o *transfert* do virus do organismo materno ao organismo do feto, em condições de integridade anatomica dos tecidos da placenta, o que caracterisa a herança da semente.

É, por consequencia, a heredo-infecção um caso particular do contagio congenito que occorre quando ha lesão dos vasos ou tecidos placentarios, que permitte a passagem directa do elemento infectante.

Ambos os casos se enquadram na denominação generica de heredo-contagio.

Bem differente é a concepção bio-pathologica assim estabelecida, da concepção biologica pura da herança, em que intervem a noção fundamental de transmissão á descendencia, por alterações intimas dos elementos geradores, dos caracteres ancestraes que são conservados com caracter especifico na evolução da especie.

Sob o prisma, pois, do heredo-contagio é que devemos estudar a possibilidade da transmissão do virus tuberculoso, da mãe ao feto, na vida intra-uterina, na independencia de phenomenos morbidos que possam estabelecer a passagem directa do virus.

Neste segundo caso haverá o contagio intra-uterino por condição accidental; haverá herança da semente por condição pathologica immanente á placenta; o virus será encontrado na maioria das vezes no organismo do feto, sob a sua forma visivel, classica, acido-resistente e se revelará na herança morbida pela *tuberculisação* do nascituro.

No primeiro caso a heredo-infecção se produz pelas trocas osmoticas dos liquidos nutritivos maternos e fetaes, sangue e lympha, dando origem

(1) Memoria apresentada ao 2o. Congresso Pan-Americano de Tuberculose, reunido no Rio de Janeiro de 30 de Junho a 7 de Julho de 1929.

a um estado, senão pathologico ao menos miopragico, capaz de mostrar variantes que attinjam em ultima modalidade a alteração especifica dos tecidos tuberculisados.

A physionomia especial que ao organismo infectado é conferida por este typo de infecção, em suas modalidades attenuadas, deriva da physiopathologia do *terreno tuberculisavel*, expressão por que é conhecida em pathologia a dyscrasia organica que caracterisa os filhos de tuberculosos.

Nestes casos não se póde pôr em evidencia o elemento infectuoso em sua forma classica, de bastonete acido-alcool-resistente.

A acção morbigena do virus é entretanto reconhecida em seus effeitos: hyperplasia do systema lymphatico, fragilidade da funcção circulatoria, alterações de nutrição decorrentes da instabilidade da funcção endo-crinica, etc., etc., caracteres morbidos que se confundem com os que possam ser attribuidos a elementos toxicos de acção duradoura e que por sua durabilidade ou permanencia por prazos mais ou menos longos, originam uma constituição morbida especial que confina com os estados que hoje em dia se enquandram na *pre-tuberculose*.

Decorre assim a noção da herança de terreno que, entretanto, nada mais representa que a infecção tuberculosa em modalidade especial, attenuada, e que com as modificações humoraes e da physio-pathologia cellular que provoca, estabelece o estado de allergia instavel á infecção classica.

Confundem-se pois, as noções de infecção e de intoxicação pela identidade de effeitos que se manifestam não só pelas alterações funccionaes, como ainda, pela producção de alterações anatomicas.

A infecção tuberculosa nos demonstra o que ficou dito com o estudo do virus filtravel.

Ahi, onde não se póde pôr em evidencia a presença do bacillo de KOCH, isto é, da fórma acido-alcool-resistente do virus, o quadro morbido se apresenta comparavel experimentalmente aos que a clinica nos mostra.

Em taes casos as hypotheses de infecção e intoxicação em meu modo de pensar, não só não se repellem como se completam. A demonstração da capacidade morbigena do virus se faz na infecção da durabilidade e permanencia d'ella, emquanto que na intoxicação esta capacidade é transitoria.

Na condição de *continuidade* de acção morbigena reside, pois, a caracteristica dos elementos filtraveis do virus, capazes de entreter um estado de intoxicação chronica e de se transmittirem em serie experimental por inoculação ou em serie natural, por passagem através da placenta, da mãe ao feto.

Em alguns casos podem estes elementos filtraveis do virus tuberculoso regenerar a fórma acido-alcool-resistente, com ou sem o seu cortejo pathologico, produzindo entretanto sempre um estado allergico instavel, conducente ora á hypersensibilidade, ora á maior resistencia á acção morbigena do virus.

Comprehende-se, pois, que um estado particular de constituição humoral se estabeleça, dando a physionomia propria ao estado de pre-tuberculose, na concepção em vigencia; mas, este estado que encontra como factor pathogenico a intoxicação chronica causada pelo virus, só por elle é entretido com a permanencia da infecção. Ora, a acção physio-pathologica

dos venenos tuberculosos se traduz pela acção das substancias elaboradas pelo virus, quer se exerça ella sobre os elementos nobres dos tecidos, principalmente do tecido lymphatico, alterando a sua constituição anatomica, quer sobre o systhema hemo-poiético, passivel de analogas alterações, quer perturbando a nutrição geral, pois que a acção desses venenos se exerce sempre sobre os systhemas endocrinico e neuro-vascular, ultimos responsaveis, no entender actual, pelo automatismo das funcções reguladoras da vida somatica.

As relações desta sorte estabelecidas entre o terreno e o virus tornam-se dia a dia mais favoraveis á eclosão da doença tuberculosa que de facto já insidiosamente existe.

O poder morbigeno do virus contrabalançado pela reacção de defeza crea o estado allergico, estado especial comparavel ao estado particular de irritabilidade cellular, determinado pela solicitação toxica; originando o estado de hypersensibilidade especifica, cujo exgottamento desencandeia o choque anaphylactico.

Do equilibrio instavel humoral estabelecido pelas defezas cellulares á solicitação dos toxicos do virus, resulta o estado humoral da *pre-disposição* á tuberculose, da constituição cellular peculiar que desta intoxicação chronica deriva, se origina o *terreno tuberculisavel*.

A noção somatica decorrente dos dois factores, estabelece o quadro clinico da *pre-tuberculose*, expressão verdadeira no sentido anatomico e etiologico, mas erronea no sentido physio-pathologico, porque nestes estados morbidos a infecção já existe, e por ella é responsavel a phase, digamos sarcodial, ultra microscopica, invisivel (ultra-virus), ou granular visivel ou pré-bacteriana.

* * *

Proseguindo o estudo das fórmas filtraveis da tuberculose institui, em Novembro de 1926, a seguinte serie experimental.

Escarro tuberculoso em emulsão em agua physiologica foi filtrado em vela CHAMBERLAND L2, depois de ter permanecido em estufa a 37°C durante 3 dias. A integridade da vela foi verificada por semeaduras do filtrado obtido, em gelose inclinada e em caldo simples e glycerinado. Os meios semeiados, mantidos quer em estufa quer á temperatura ambiente se conservaram estereis.

Com o filtrado foram injectados:

Sob a pelle (10 c.c. do filtrado) — cob. nº. 1 (macho).
" " " (10 c.c. do filtrado) — cob. nº. 2 (femea).
No peritoneo (5 c.c. do filtrado) — cob. nº. 3 (macho).

A 18 de Fevereiro de 1927 morreu a cob. nº. 1, cachectica.

A autopsia mostrou ausencia de lesões especificas e de bacillos acido-alcool-resistentes. No pulmão foram encontrados infartos e hemorrhagias capillares. O estudo dos cortes do figado, baço e ganglios e das lesões encontradas nos pulmões não revelou a presença de lesões especificas nem de bacillos acido-alcool-resistentes.

Procedi á inoculação da seguinte serie com o material proveniente deste animal.

Cob. I — Injectada sob a pelle com polpa do baço.
Cob. II — Idem, idem, com fragmentos do pulmão.
Cob. III — Idem, idem, com fragmentos do epiploon.
Cob. IV — (femea) — Injectada com agua da lavagem do pulmão e figado.

A 20-2-27 morte da Cob. I por causa intercorrente. A autopsia mostrou ausencia de lesões especificas e de bacillos acido-alcool-resistentes.

A 24-2-27 morte da Cob. III. A autopsia revelou a presença de ganglios epiploicos augmentados. Ausencia de lesões especificas. Nos ganglios epiploicos foram encontradas granulações acido-alcool-resistentes. Não foram encontradas nem nas visceras nem nos outros ganglios bacillos acido-alcool-resistentes.

Com material deste animal (ganglios epiploicos) foi inoculada uma Cob. IIIA (macho).

Em 28-2-27 morte da Cob. II. As verificações feitas por autopsia foram identicas ás da Cob. I.

A Cob. IIIA (macho) que fôra inoculada em 24-2-27 com o material da Cob. III, ao cabo de 8 dias mostrou um abcesso no ponto da inoculação, que se rompendo constituiu uma ulceração com aspecto de cancro. Preparações por esfregaço do producto da raspagem dos bordos do cancro mostraram a presença de bacillos acido-alcool-resistentes.

O ganglio inguinal satellite á ulceração apresentava-se augmentado de volume. Ao cabo de 1 mez a ulceração cicatrizou.

A 28-4-28 morte desta cobaya. A autopsia revelou a ausencia de lesões tuberculosas. Infarctos pulmonares e presença de bacillos acido-alcool-resistentes e de forma granular nos ganglios tracheo-bronchicos.

O ganglio satellite ao cancro foi extirpado. Examinado por córte e esfregaços não apresentou caseificação nem bacillos acido-alcool-resistentes.

O resto do material foi inoculado sob a pelle de uma outra cobaya.

Esta ultima morreu 5 dias mais tarde, sem lesão e sem causa apparente; as culturas feitas com o sangue do coração permaneceram estereis.

O mesmo ganglio foi deste animal transplantado para um outro sob a mesma technica.

Este ultimo animal morreu 5 dias depois, e, como a cobaya anterior, não apresentava lesões apparentes nem germens no sangue do coração.

A cobaya IV (femea), que fôra injectada em 18-2-27 e que cohabitava com o macho III, desde 24-2-27, pariu em 29-9-27 um filhote, o qual ao cabo de 5 dias morreu. A autopsia revelou uma zona de caseificação e de necrose no figado, hemorrhagias e infarctos pulmonares e augmento de volume de ganglios epiploicos. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes.

Um pequeno fragmento de um ganglio epiploico foi inoculado sob a pelle de uma outra cobaya. Este ultimo animal mostrou após 12 dias o começo de formação de um cancro, por ulceração do ponto de inoculação. O cancro formado se conservou aberto durante 1 mez. Não foram encontrados bacillos acido-alcool-resistentes nesta lesão. O cancro cicatrizou e o

animal ainda vive, sem aspecto de tuberculose mas excessivamente gordo (peso actual 980 grammas).

Em 8-12-27 nasceram mais dous filhotes que morreram em Maio de 1928 sem lesões tuberculosas e sem bacillos mas apresentando uma polyadenia inguinal accentuada.

As cobayas 2 (femea) e 3 (macho) procrearam tambem. O primeiro filhote nasceu em 14-9-27 e morreu depois de 15 dias. A autopsia mostrou infartos pulmonares, hemorrhagias capillares do pulmão e uma zona de necrose no figado. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes.

Em 8-12-27 nasceram dous outros filhotes, com aspecto normal, mas tendo os ganglios augmentados de volume. Um morreu em 8-5-28 e o outro em 14-5-28. Ambos não apresentavam nem lesões tuberculosas nem bacillos.

O quadro synoptico da pagina 173 dará idéa mais approximada do proseguimento e das observações da serie experimental acima transcripta.

* * *

A experimentação extrangeira condiz em traços geraes com as conclusões a que pude chegar e que serão expostas em outra parte deste trabalho.

Desde as communicações fundamentaes de CALMETTE, VALTIS, NÈGRE, BOQUET (2), de F. ARLOING e DUFOURT (3) grande copia de trabalhos publicados nestes ultimos annos confirma a possibilidade da passagem das formas filtraveis do virus tuberculoso através da placenta materna originando a infecção do féto.

CALMETTE, VALTIS e LACOMME (4) SERGENT, DURAND e BENDA (5), COUVELAIRE (6) em França, MOENKEBERG, ONETTO e VERGARA (7) no Chile, NISHIMOTO (8) no Japão, NASSO (9) na Italia, VAN BENEDEN (10) na Belgica, LYDIA RABINOWITSCH (11) na Allemanha, todos trazem farta documentação ao phenomeno bio-pathologico do heredo-contagio na tuberculose. E da experimentação apresentada resulta que o contagio se dá independentemente de lesão da placenta, assumindo a expressão *herança de semente*, toda a plenitude de sua significação biologica.

A observação clinica traz ainda ampla documentação ao phenomeno citado.

ARLOING e DUFOURT (3) em 1926 communicam á Academie de Medecine de Paris o seguinte caso:

Parto prematuro no 7º mez, de mãe tuberculosa com lesões pulmonares avançadas, em 31 de outubro de 1925. Féto pesando 1.310 grs.; peso da placenta 310 grs.

A criança immediatamente separada da mãe é criada em *couveuse*.

O exame somatico da criança nada revela. A temperatura oscilla 34º2 e 35ºC. A 9 de Novembro a temperatura attinge a 37º e se mantem assim até os ultimos dias.

Cob. inj. sob a pelle (2) 10 c.c. do filtrado

1) *Morte.* (18-2-27) CACHEXIA. Autop. ausencia de lesões especificas e de bacillos alcool-acido-resistentes INFARCTUS e HEMORRHAGIAS PULMONARES. Material retirado para inoculação.

2) Viva FEMEA. B

Cob. I Inj. polpa do baço. *Morte* em 20-2-27. Causa intercurrente. Ausencia de lesões especificas e de bacillos acido-alcool-resistentes.

Cob. II Inj. polpa do pulmão. *Morte* em 28-2-27 Idem Idem cob. I.

Cob. III Injectada com fragmento de epiploon. *Morte* em 24-2-27. GANGLIO EPIPLOON AUGMENTADO. PRESENÇA DE GRANULAÇÕES ACIDO-ALCOOL-RESISTENTES. Inoculação deste material em 1 cob. IIIa (MACHO)

Cob. IIIa. *8 dias depois abcesso e formação de Cancro.* PRESENÇA NA LESÃO DE BACILLOS ACIDO-ALCOOL-RESISTENTES. GANGLIO INGUINAL AUGMENTADO, cicatrisação da ulcera ao cabo de 1 mez. Ext. do ganglio. Ausencia de caseificação. Ausencia de bacillos.

Cob. IIIa. *Morte* em 28-4-28. Ausencia de lesão tuberculosa. CACHEXIA — INFARCTUS PULMONAR. PRESENÇA DE BACILLOS ACIDO-ALCOOL-RESISTENTES e de forma granular (ganglios tracheo-bronchicos).

Inoculação do ganglio sob a pelle de 1 cobaya.

Morte. 5 dias depois sem lesão. Sangue do coração esteril. Passagem do mesmo sangue em outra cobaya.

Morte. 5 dias depois sem lesão. Sangue coração esteril

Cob. IV Inj. com agua de lavagem do pulmão e figado. (Viva) FEMEA.

Cob. IIIa. MACHO. + Cob. IV. FEMEA.

1o. Parto 29-9-27

2o. Parto 8-12-27

ob. morta 5 dias apos. *Zona de caseif. e necros. no figad. Hemor. infart. pulmo. Gang. epi. augment.* Ausencia de bac. ac. alc. resist. Inoc. de um frag. do gang. em 1 cobaya.

Cancro 12 dias depois da inoculação que se conservou aberto durante 1 mez. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes. Conserva-se viva.

Duas cob. *Poliad. ingui. Morte de ambas* em Maio de 1928. CACHEXIA. Ausencia de lesão tuberculosa e de bacillos acido-alcool-resistentes.

A + B

Cob. Inj. no peritoneo MACHO.—A 5 c.c. do filtrado. (Viva)

1o parto (14-9-27) COB. morta 15 dias apos ter nascido. INFARCTUS PULMONAR. HEMORRHAGIA CAPILLAR DO PULMÃO ZONA DE NECROSE NO FIGADO. Ausencia de bacillos acido-alcool-resistentes.

2o parto † (8-12-27) 2 Cob. com aspecto normal. GANGLIO INGUINAL AUGMENTADO. Morte de 1 em 8-5-28 e de outra em 14-5-28. Ausensencia de lesão tuberculosa e de bacillos.

A criança falleceu a 25 de Dezembro. O peso tomado durante o periodo de vida foi o seguinte:

Peso inicial — 31 de Out.: 1310 grs.
12 de Nov.: 1300 «
22 de Nov.: 1400 »
3 de Dez.: 1490 »
9 de Dez.: 1440 «
20 de Dez.: 1170 «

Nos ultimos cinco dias de vida a perda de peso foi rapida, sem nenhum phenomeno especial morbido que pudesse explicar não só a perda de peso como a causa da morte.

Por autopsia nada de anormal se encontrou, salvo uma pequena hypertrophia dos ganglios mesentericos.

Com fragmentos de visceras procederam á inoculação de cobayas que se conservaram em saude. Os ganglios mesentericos mostraram por esfregaços a presença de bacillos acido-alcool-resistentes. *A inoculação do filtrado de emulsão destes ganglios em cobayas determinou a morte dos animaes inoculados por cachexia, apresentando bacillos acido-alcool-resistentes em seus ganglios.*

As observações de CALMETTE, VALTIS e LACOMME (12) permittiram a estes sabios a seguinte conclusão:

"No curso de certas affecções tuberculosas graves, a passagem do virus tuberculoso da mãe ao féto, durante a gestação, póde se produzir menos excepcionalmente do que se acreditara até aqui: A infecção tuberculosa transplacentaria as mais das vezes é realizada por elementos invisiveis ao microscopio, filtraveis através vélas de porcellana porosa".

Posteriormente, ainda CALMETTE e seus collaboradores apresentam á Academie des Sciences (12) as seguintes conclusões:

"Esta infecção transplacentaria apresenta caracteres muito particulares, diversos da infecção realisada pela transmissão directa das fórmas normaes do bacillo de KOCH, de modo que se é levado a distinguir a herança bacillar propriamente dita, que é rara, da infecção transplacentaria pelo ultra-virus, que pelo contrario é muito frequente e que quando não determina a morte rapida do féto, ou do recem-nascido por desnutrição progressiva, não parece trazer consequencias graves para a saude dos lactentes, desde que não sejam estes expostos ás reinfecções bacillares no meio familiar".

Conclusões analogas ainda que ampliadas foram apresentadas por CALMETTE (13) á VI Conférence Internationale de Tuberculose.

* * *

A acção pathogenica dos elementos filtraveis do virus tuberculoso acha-se sobejamente demonstrada. E a possivel passagem destes elementos através a placenta fornece a chave do intrincado problema da herança morbida na tuberculose.

Ainda ahi a observação clinica condiz com a observação experimental. Encontra-se forte analogia entre os quadros morbidos determinados pela inoculação experimental destes elementos e o que representa a noção

antiga da pretuberculose, do temperamento lymphatico, do terreno predisposto.

Desde os meus primeiros trabalhos em 1910 (1) aos de VAUDREMER em 1921 (14) de VAUDREMER e de seus collaboradores (15, 16, 17, 18) nos annos seguintes, até os mais recentes, dos AA. anteriormente citados, se reconhece que a infecção determinada pelos elementos filtraveis do virus aberra da forma classica da infecção tuberculosa, caracterisando-se principalmente por um quadro clinico distrophico, que é o mais commum, cachectisante, e que em 8 a 10 % dos animaes inoculados, segundo MALARTRE (19), ou que na relação de 3 %, segundo CALMETTE (13), evolue para a forma classica.

ARLOING, DUFOURT e MALARTRE (19) traçaram nitidamente as caracteristicas dessas formas, classificando-as em fórma nodular, a mais rara, fórma cachectisante, a mais commum, e fórma ephemera curavel, sómente reconhecivel esta ultima, pela reacção allergica fugaz, posta em evidencia pela tuberculina.

Abre-se assim uma nova via de experimentação para a elucidação da immunidade relativa dos filhos de tuberculosos, que se traduz pela maior resistencia á evolução não só do virus como da doença, creando os estados escrofulosos, ou chronicos da fórma classica da infecção.

As experiencias de BOQUET, NEGRE, VALTIS (20), de MAC JUNKIN (21) PARAF (22), de ARLOING, THEVENOT, DUFOURT e MALARTRE (23), permittem concluir em um certo gráo de resistencia conferido ao organismo da cobaya por inoculação dos elementos filtraveis do virus, á uma infecção posterior virulenta pela forma acido-alcool-resistente.

Em apoio a esta interpretação fallam ainda a experimentação de VAN BENEDEN (24) obtendo na cobaya o phenomeno de KOCH em virtude de duas inoculações de ultra-virus tuberculoso, contido em dous vehiculos differentes (filtrado do derrame pleuritico, filtrado de expectoração), e a de VALTIS, SAENZ e MONALDI (25) que confirmam as experiencias de DEBRE, LELONG e BONNET (26).

É de prevêr pois que: *a vaccinação dos filhos de tuberculosos se possa estabelecer, por condições ainda não determinadas, de dóses vaccinantes repetidas, nas fórmas ephemeras ou curaveis da infecção transplacentaria, pelos elementos filtraveis do virus.*

* * *

Em Outubro de 1927, tive opportunidade de, perante o 1º Congresso Pan-Americano de Tuberculose, reunido em Cordoba, communicar as primeiras conclusões da serie experimental que expuz na primeira parte deste trabalho.

Podem em minha opinião ser interpretados os factos experimentaes observados como devidos á acção dos elementos filtraveis do virus tuberculoso, os quaes exerceram seu poder morbigeno, determinando a morte da primeira cobaya por cachexia. Reinoculado no segundo animal, o virus determinou a formação do cancro no ponto de inoculação (*o que está em opposição á observação geral sobre a acção pathogenica do virus*), com regeneração de formas acido-alcool-resistentes.

As fórmas acido-alcool-resistentes foram reabsorvidas, mas o ganglio satellite, transplantado para outra cobaya, *produziu, em duas passagens successivas, a morte do animal em 5 dias.*

Por outro lado, o poder morbigeno do virus se manifestou, uma vez em primeira passagem, outra vez em segunda passagem no organismo materno, e, em *terceira passagem no organismo dos fétos*, os quaes apresentaram sempre lesões identicas: infarctos pulmonares, hemorrhagias capillares do pulmão, necrose e caseificação do figado, polyadenia e cachexia.

Em um caso, em quarta passagem houve formação de um cancro typico, que cicatrizou no fim de 1 mez. *Em nenhum caso foi encontrado o elemento virulento sob a fórma de bacillo acido-alcool-resistente.*

Tudo se passou nesta experimentação como se uma infecção latente minasse a resistencia organica, por perturbações funccionaes perennes, produzindo a formação de lesões que puderam ser verificadas.

Este estado discrasico era transmissivel da mãe ao feto, affirmando assim a noção de *herança morbida*. Da serie experimental acima mencionada, resulta ainda o facto interessante de ter sido o virus tuberculoso, reconhecivel pela fórma acido-alcool-resistente, encontrado sómente naquelles casos em que a infecção pelos elementos filtraveis fôra obtida por inoculação directa do virus.

Nos casos em que interveio o phenomeno biologico da herança, esta só se manifestou pelo poder morbigeno, com as alterações funccionaes e anatomicas delle decorrentes, sem que o elemento *figurado* etiologico pudesse ser evidenciado.

Esta observação mostra que *mesmo nos casos em que a passagem do elemento figurado do virus tuberculoso* (bacillo acido-alcool-resistente) *da mãe ao feto não se realise, a herança morbida se dá.*

Estabeleceremos assim a noção do pathenergogeno, isto é da *energia morbigena* immanente á materia heterologa, e que no caso actual se dissocia da noção de ultra-virus, considerado este como uma phase metacyclica germinal do virus tuberculoso, ou da fórma granular deste virus, interpretada por mim como phase integralisadora, biogenica, no cyclo vital do bacillo de KOCH.

Ao elemento morbigeno que acompanha o virus tuberculoso, que não é cultivavel *in vitro*, nem revelavel morphicamente *in vivo*, mas que é transmissivel em serie experimental por inoculação directa, ou por passagem natural através da placenta, reconhecivel só pelos seus effeitos e que se caracterisa ainda pela continuação destes mesmos caracteres, eu considero responsavel pela herança morbida na infecção tuberculosa e denomino de *pathenergogeno.*

CONCLUSÕES.

O legado morbido da mãe ao féto se realisa na infecção tuberculosa por via placentaria, permittindo nos casos mais raros, a evolução do agente etiologico até a fórma classica conhecida, representada pelo bastonete acido-alcool-resistente; transmittindo a potencialidade de evolução deste agente, reconhecivel através de passagens subsequentes em organismos

sensiveis, em casos mais frequentes, e conferindo em casos muito mais numerosos, uma doença tuberculosa atypica, que se manifesta por alterações do systhema lymphatico, taes como micro-polyadenia, hyperplasia dos ganglios, por infarctos e hemorrhagias capillares, por alterações necroticas dos tecidos e das visceras, e por profunda perturbação do metabolismo nutritivo, que póde attingir ao extremo gráo de determinar a morte.

As lesões e perturbações funccionaes que caracterisam a molestia tuberculose atypica foram encontradas por todos os investigadores que se tem preoccupado com o assumpto, mesmo por aquelles que concluem pela não existencia da fórma filtravel do virus, interpretando-as como produzidas por acção toxica.

Esta interpretação não póde ser mantida em virtude do facto que estas lesões são transmissiveis por inoculação em serie e que elles se repetem mesmo quando o elemento pathogenico provem de um organismo que o recebera por legado materno transplancetario (FONTES) (27).

Na infecção tuberculosa se dá, pois, o heredo-contagio e a herança morbida que d'elle deriva.

BIBLIOGRAPHIA

1—FONTES, A.—Memorias do Inst. Osw. Cruz. T. 2—1910.

2—CALMETTE, VALTIS, NEGRE et BOQUET—C. R. Ac. Sc. T. 181 pag. 491 – 1925.

3—ARLOING et DUFOURT—C. R. Ac. Sc. T. 181, pag. 826—1925. Bul. Ac. Med. T. 96, pg. 301—1926.

4—CALMETTE, VALTIS et LACOMME—C. R. Ac. Sc. T. 183, pg. 835 – 1926.

5—SERGENT, DURANT et BENDA—Bul. Ac. Med.—7 Dez. 1926.

6—COUVELAIRE—Presse Médicale 19 Fevrier. 1926.

7—MOENKEBERG, ONETTO e VERGARA—1º. Cong. Pan-Amer. de Tuberculosis.
Cordoba Out. 1927. R. Arg.

8—SADAOMI NISHIMOTO – Ref. of the Japan—Med. World. Vol. VII n. 9 Sept. 15. 1927.

9—IVO NASSO—Le Riforma Medica n. 51 Dec. 1927.

10—VAN BENEDEN—Brux. Med. pg. 1493 – 1927.

11—LYDIA RABINOVITSCH KEMPNER – Deut. Med. Woch. Nov. 1927.

12—CALMETTE, VALTIS et LACOMME – Presse Méd. 10 Nov. 1926.—C. R. Acd. de Sc. 186—18 Juin. 1928.

13—CALMETTE,—Rapport à la VI Conf. Int. de la Tuberc.
Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXVI n. 20 pg. 889.

14—VAUDREMER—C. R. Soc. Biol. T. 89, pg. 80.

15—HAUDUROY et VAUDREMER—C. R. Sc. Biol. T. 89, pg. 1276.

16—VAUDREMER—Bul. Ac. Méd. T. 95, pg. 440. 1926.

17—VAUDREMER – Le Bacille Tuberculeux 1 vol. Presses Universitaires – 1927.

18—VAUDREMER, PUTHOMME et PAULIN – Bul. Ac. Méd. T. 97, pg. 202—1927.

19—MALARTRE—Thèse de Lyon.—Apud. HAUDUROY—Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes.—1 vol. Masson & Cia. 1929.
20—BOQUET, NÈGRE et VALTIS—C. R. Soc. Biol. T. 94 pag. 235—1926.
21—MAC JUNKIN—J. Exp. Med.—T. 33, 751.
22—PARAF—C. R. Soc. Biol.—T. 92, 792.
23—ARLOING, THEVENOT, DUFOURT et MALARTRE—Ac. Méd. 11 Octo. 1927 pg. 208.
24—VAN BENEDEN—C. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1560.
25—VALTIS, SAENS et MONALDI—B. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1558.
26—DEBRÉ, LELONG et BONNET—C. R. Soc. Biol. T. XCV pg. 1425.
27—FONTES, A. - Communicação á VI Conferencia Internacional de Tuberculose, reunida em Roma Set. 1928.

ON HEREDO-INFECTION IN TUBERCULOSIS (1)

By Dr. A. FONTES

of the Oswaldo Cruz Institute, Official Relator of the Thema.

"Another very important point to be brought to light is that of tuberculous inheritance: nothing prevents the granulation from passing to the fetus, considering its proportions which are not an obstacle to its going through the filter".

". . . ,, the notion of tuberculizable ground is likely to be replaced, if not completely, at least in most of cases, by *that of tuberculosis in potential*".

A. FONTES (1910)

Mem. of the Inst. Osw. Cruz (1)

By heredo-infection in tuberculosis, we should uuderstand transmission of the tuberculous virus from the mother to the fetus, through the placenta, the placental tissue remaining untouched.

Then it is the transfer of the virus from the maternal organism to the organism of the fetus, under conditions of anatomical integrity of the tissue of the placenta, that characterizes the inheritance of the semen.

Heredo-infection is consequently a particular incidence of congenital contagion, which arises whenever there is a lesion in the vessels or in the tissues of the placenta, allowing direct passing through of the infectant element.

Both cases may be comprised under the generic name of heredo-contagion.

Most different is thus, the bio-pathologic conceit here established, from the mere biologic conceit of inheritance, in which the fundamental notion of transmission to offspring interferes, by way of intime changes of the generating elements, of ancestral characters which are being kept with their specific aspect in the evolution of the brood.

The possibility of transmission of the tuberculous vtrus, from the mother to the fetus, during intra-uterine life, should be then studied, keeping in mind the theory of heredo-contagion, quite independent of morbid phenomenons likely to establish the possibility of direct pnssing of the virus.

In this second case, then, it will mean intra-uterine contagion owing to accidental cause; the case will be of inheritance of the semen by a pathologic condition inherent to the placenta; the virus will be found in most cases, in the fetal organism, under its visible, classical acid-fast ap-

(1) Memorial read before the 2nd Pan American Congress of Tuberculosis, held in Rio ed Janeiro from the 30th of June to 7th of July 1929.

pearance, and will be revealed, in morbid inheritance, by tuberculization of the child to be born.

In the first case, heredo-infection is provoked by osmotic exchanges of the feeding maternal and fetal fluids, blood and lymph, creating a condition, if not pathologic, at least miopragic, which may appear with varying stages, whose last modality is a specific change of the tuberculized tissues.

The special physionomy this type of infection bestow on the infected organism, under its slightest forms, is bound with the physiopathology of the *tuberculizable ground*, an expression which means in pathology the organic dyscrasia, specific of children from tuberculous parents.

In such cases, the infectious element cannot be made patent under its classical form of an acid-alcool-fast rod.

The morbigenous action of the virus in nevertheless made obvious in its effects: hyperplasia of the lymphatic system, weakness of the circulative function, nutritional changes consequent to instability of the endocrinous function, etc., etc., all morbid characters which may be confounded with those subject to being ascribed to toxical elements of durable action, and whose durability or persistence for a longer or shorter time, may cause them to determine a special morbid constitution approaching the conditions which nowadays are comprised under the word: pre-tuberculosis.

This is the meaning of the notion of inheritance of ground, which, besides, represents nothing else but tuberculous infection under a special weakened modality, which, with humoral changes, and the cellular physiopathology it determines, establishes the condition of instable allergy in the classical infection.

The notions of infection and intoxication are thus coinciding, owing to their identity of effects, which are observed not merely by functional changes, but also by appearing anatomical alterations.

Tuberculous infection demonstrates what has been told by occasion of studying the filtrable virus.

In such cases, where the presence of KOCH's bacillus cannot be made obvious, that is, of the acid-alcohol-fast form of the virus), the morbid frame shows itself, experimentally, comparable with those revealed by clinic.

In my opinion, the hypothesis of infection and intoxication, under such circumstances, not only are not adverse, but even complementary one to other. The demonstrations of the morbigenous capacity of the virus may be made, in infection, by its durability and its permanency, whereas, in intoxication, this property is transient.

It is, accordingly, in the condition of continuity of the morbigenous action, that reside the characteristic of the filtrable elements of the virus, subject to maintain a condition of chronical intoxication and to be transmitted, in experimental series, by inoculation, or in natural series, by passage through the placenta, from the mother to the fetus.

In some cases, these filtrable elements of the tuberculous virus may reproduce the acid-alcohol-resistent form, with or without its pathologic sequence, provoking, however, always an instable allergic condition, which

may lead, either to hypersensibility, or to a greater resistence against the morbigenous action of the virus.

Thus remains explained that a particular condition of the humoral constitution may be created, that gives the case special physionomy of pre-tubercular state, under the prevailing conceit; butthis state, which finds as its pathogenic factor, the chronical intoxication caused by the virus, is maintained only by the same factor with the permanency of the infection. Accordingly, the physio-pathologic action of tuberculous venoms, is shown by the action of the substances elaborated by the virus, either it be exercised on the noble elements of the tissue, specially of the lymphatic tissue, bringing changes into its anatomical constitution, or on the hemo-poietic system, subject to similar changes, or even causing troubles in the general nutriment, for the action of these venoms is always suffered by the endocrinic and neuro-vascular systems, on which repose, in the present state of knowledge, the automatism of the functions wich regulate somatic life.

The relations thus established between the ground and the virus, grow daily more favorable to the outburst of the tuberculous disease, which in fact, is already existing insidiously.

The morbigenous power of the virus counterweighed by the defence reaction, creates an allergic condition, a special state which may be compared to the particular state of the cellular irritableness, determined by the toxical tendency; it gives way to a condition of specific hypersensibility, whose exhaustment leaves plain field to the anaphylactic blow to take place. From the instable humoral equilibrium established by the cellular defence against the attack of the poisons of the virus, results the humoral condition of the *pre-disposition* to tuberculosis; from the peculiar cellular condition deriving from this chronical intoxication, decurs the appearance of the *tuberculizable ground.*

The somatic notion resulting from both factors, establishes the clinical frame of *pre-tuberculosis*, the true term under the anatomical and etiologic points of view, but wrong if considered physio-pathologically, for, in such morbid states, infection already exists, for which the stage, we might say, the sarcodial, ultra-microscopical, invisible (ultra-virus) or visible granular or pre-bacterian stage, must account.

* * *

Going further in the study of the filtrable forms of tuberculosis, I effected, in November 1926, the following series of experiments.

Tuberculus sputum emulsioned in a saline solution, was filtered upon a CHAMBERLAND device L2, after a stage of three days in the dry-oven at 37°C. The perfect state of the filter was verified by means of smearings of the filtrate obtained on slanting gelose and in plain glycerine broth. The smeared media, maintained either in the dry-oven or at the laboratory's temperature remained sterile.

With such filtrate, I injected :

Sub-cutaneously (10 c.c. of the filtrate)—Guinea pig No. 1 (male).
« « (10 c.c. of the filtrate)—Guinea pig No. 2 (female).
Intra-peritoneally (5 c.c. of the filtrate)—Guinea pig No. 3 (male).

On the 28th February 1927, the Guinea pig No. I died, cachectic.

Autopsy showed absence of specific changes and of acid-alcohol-fast bacilli. In the lung we found infarcts and capillar hemorrhages. An examination of cuts of the liver, spleen and ganglia as also of the lesions found in the lungs did not reveal the presence of specific changes or of acid-alcohol-fast bacilli.

With the material obtained from this animal, I effected inoculations to a following series:

Guinea pig No. I — Injected sub-cutaneously with pulp of spleen.
Guinea pig No. II — idem, idem, with fragments of lung.
Guinea pig No. III — idem, idem, with fragments of epiploon.
Guinea pig No. IV — (female) — Injected with the water used for washing the lung and liver.

20. 2. 27.—The Guinea pig No. I dies from an interfering cause. The autopsy did not show specific lesions nor acid-alcohol-fast bacilli.

24. 2. 27.—Gu. pig. No. III dies.—Autopsy revealed increased epiploic ganglia. No specific lesions. In the epiploic ganglia, acid-alcohol-fast granulations were discovered. No trace of acid-alcohol-fast bacilli either in viscera or in the other ganglia.

The material from this animal (epipoic ganglia) was used to inject a Gu. pig IIIA (male).

On 28. 2. 27. Gu. pig II dies. Examination gave results quite identical to that observed in Gu. pig I.

The Guinea pig IIIA (male) which had been inoculated on the 24. 2. 27 with material proceeding from Gu. pig III, showed, after 8 days, an abscess at the inoculation spot, which bursting out, turned to an ulceration with the appearance of a chancre. Preparations made with rubbings of the rands of this chancre, revealed the presence of acid-alcohol-fast bacilli.

The inguinal ganglion, satellite of the ulceration, showed increase in volume. After one month, the ulceration was cicatrized.

28. 4. 28, this Guinea pig died. The autopsy showed no tuberculous lesions. Pulmonar infarcts; presence of acid-alcohol-fast bacilli, of granular shape in the tracheo-bronchial ganglia.

The ganglion, satellite of the chancre, was extirpated. Examination of cut and rubbings did not show cheesy degeneration nor acid-alcohol-fast bacilli.

The remainder of the material was injected under the skin of another Guinea pig.

This latter died 5 days later, without any lesion or without apparent cause; smearings made with the blood of the heart remained sterile.

The same ganglion of this animal was transplanted to another one, by the same technique.

This animal died after 3 days, and like the former Guinea pig, did not show any apparent lesion nor germs in the heart blood.

Guinea pig IV (female), injected on the 18. 2. 27 and which lived together with the male III, from the 24 2. 27, brought forth on the 29. 9. 27 a young one, which died after 5 days. Autopsy revealed a zone of cheesy degeneration and necrosis in the liver, hemorrhages and infarcts in the lungs and increased volume of epiploic ganglia. No acid-alcohol-fast bacilli.

A small piece of an epiploic ganglion was inoculated sub-cutaneously to another Guinea pig. After 12 days, this latter showed a chancre beginning to form, through ulceration of the injected spot. The formed chancre kept open for one month. No acid-alcohol-fast bacilli were found within this lesion. The chancre cicatrized, and the animal is still alive, without the aspect of tuberculous, but rather exceedingly fat (actual weight 980 grams).

On the 8. 12. 27, two more young ones were born, which died in May of 1928, without tuberculous lesions and without bacilli, but showing very marked inguinal polyadenia.

The Guinea pigs 2 (female) and 3 (male) procreated also. The first young one was born on the 14. 9. 27 and died after 15 days. The autopsy revealed pulmonar infarcts, capillar hemorrhages in the lungs and a necrotic zone in the liver. No acid-alcohol-fast bacilli.

On the 8. 2. 27, two more young ones were born, of a normal appearance, but with the ganglia increased. One died on the 8. 5. 28, the other one on the 14. 5. 28. Both showed neither tuberculous lesions nor bacilli.

The following synoptic table will give a more approaching idea of the decurring of of the process and the observations about the experimental series as described hereabove:

* * *

Foreign experiments generally confirm the conclusions I was led to, which will be exposed in a further part of the present work.

Since the fundamental communications of CALMETTE, VALTIS, NEGRE, BOQUET (2), F. ARLOING and DUFOURT (3) numerous works, published in the course of these last few years, have confirmed the possibility of the tuberculous virus passing through the mother's placenta and causing infection to the fetus.

CALMETTE, VALTIS and LACOMME (4), SERGENT, DURAND and BENDA (5), COUVELAIRE (6) in France, MOENKEBERG, ONETTO and VERGARA (7) in Chile, NISHIMOTO (8) in Japan, NASSO (9) in Italy, VAN BENEDEN (10) in Belgium, LYDIA RABINOWITSCH (11) in Germany, all of them bring an ample contribution of documents to the bio-pathologic phenomenon of the heredo-contagion in tuberculosis. And from the experiments afforded, results that contagion is caused without any dependence on lesion of the placenta, thus being fully justified the meaning of the expression *Inheritance of semen*, biologically speaking.

Clinical observation brings also a wide documentation to the said phenomenon.

ARLOING and DUFOURT (3) in 1926, report the following case to the Paris Academy of Medicine:

Early birth on the 7th month, from tuberculous mother with advanced pulmonar lesions, on the 31st October 1925. Fetus weighs 1,310 gram; placenta weighs 310 gs.

Immediately after the birth, the baby is taken off from mother and brought up in the *couveuse*.

Somatic examination of the baby reveals nothing. Temperature oscillates between 34°,2 and 35°C. On 9th November, temperature reaches at 37° and keeps unchanged until the last days of life.

Gu. pig inoc. subcutan (2) 10 c.c. of filtrate

1) *Death.* (18. 2. 27) CACHEXY. Autop. absence of specific lesions and of alc. ac. fast bacilli INFARCT and PULMONAR HEMORRHAGES. Material extracted for further inoculation.

FEMALE B

2) Alive

Gu. pig I inoc. pulp of spleen → *Death* 20. 2. 27. Interfering cause. Absence of specific lesions and of acid-alcohol-fast bacilli.

Gu. pig. II Inj. pulp of lung. *Death* 28. 2. 27 Idem Idem Gu. p. I.

Gu. pig III Inj. with fragm. of epiploon. → *Death* 24. 2. 27 GANGLION, EPIPLOON INCREASED. PRESENCE OF ACID-ALCOHOL-FAST GRANULATIONS. → Inoc. this material to 1 Gu. pig IIIa (MALE)

Gu. pig IIIa. *After 8 days, abscess and formation of chancre.* IN THE LESION, PRESENCE OF ACID-ALCOHOL-FAST BACILLI. INGUINAL GANGLION INCREASED, ulcer cicatrized after one month. Ganglion exturpated. No cheesy degeneration. No bacilli. → Gu. pig IIIa. *Death* 28. 4. 28. Absence of tuberculous lesions. CACHEXY. PULMONAR INFARCT. PRESENCE OF ACID-ALCOHOL-FAST BACILLI and of granulous form (Tracheo-bronchic ganglia)

Ganglion inoculated subcutaneously to a Guinea pig → *Dies 5 days later* without lesion. Heart blood sterile. This same blood is passed to another Guinea pig. → *Dies 5 days later* without lesion. Heart blood sterile.

Gu. p. IIIa. MALE. → First birth 29. 9. 27. → Gu. p. dies 5 days later. *Zone of cheesy degeneration and necrosis in liver. Hemorrh. Pulm. Infarct. Epip. gangl. increased.* No acid-alcohol-fast bacilli. A frag. of the gang. is inoc. to a Guinea pig. → *Chancre after 12 days*, remaining open for one month. No acid-alcohol-fast bacilli. Still alive.

Gu. p. IV. FEMALE. → Second birth 8. 12. 27 → 2 Gu. pig. *Inguinal polyaden. Both died* in May 1928. CACHEXY. Neither tuberculous lesion nor acid-alcohol-fast bacilli.

Gu. pig inoculated intraperit. MALE. A 5 c.c. of filtrate. (Alive)

A + B

First birth (14.9.27) → Gu. pig. died on its 15th day. PULMONAR INFARCT. — CAPILLAR HEMORRHAGE IN LUNG. NECROTIC ZONE IN LIVER. Absence of acid-alcohol-fast bacilli.

Second birth † (8. 12. 27) → 2 Gu. pigs with normal aspect. INGUINAL GANGLION INCREASED. One died 8. 5. 28, the other on 14. 5. 28. Absence of tuberculous lesions and of bacilli.

The baby dies on the 25th December. These are the weights recorded during the period of life:

Weight when born —	31th October:	1,310 gram
	12th November:	1,300 »
	22nd November:	1,400 «
	3rd December:	1,490 «
	9th December:	1,440 »
	20th December:	1,170 «

During the last 5 days of life, the decrease of weight was rapid, without appearing any special morbid phenomenon that could account as well for the loss of weight as for the causa mortis.

Autopsy revealed nothing abnormal, except a slight hypertrophy of the mesenterial ganglia.

With fragments of the viscera, several inoculations were effected on Guinea pigs, which all kept in good condition of health. Rubbings from the mesenterial ganglia revealed presence of acid-alcohol-fast bacilli. *The inoculation of the filtrate of an emulsion of these ganglia to Guinea pigs, determined the death of the inoculated animals by cachexy, their ganglia showing acid-alcohol-fast bacilli.*

CALMETTE, VALTIS and LACOMME's (12) observations enabled these celebrated investigators to draw the following conclusions:

"In the course of certain severe tuberculous affections, the passage of the tuberculous virus from the mother to the fetus, during pregnancy, may appear with less exception as was thought up to now: The transplacental tuberculous infection, is most often ascribable to elements microscopically invisible, but filtrable through earthen bougies".

Later on, CALMETTE and his co-workers, inform again the Academy of Sciences (12) of their conclusions as follows:

"This transplacental infection presents very peculiar and varied characters, of the infection obtained by direct transmission of the normal forms of the KOCH's bacillus, so that this may lead to distinguishing the proper bacillar inheritance, this being rare, from the transplacental infection by the ultra virus, which on the contrary, is most frequent, and when not determining the rapid death of the fetus, of the new-born child, by progressive disassimilation, does not appear to bring serious consequences for the health of the sucklings, since they are kept from bacillar reinfections in their family circle".

Similar conclusions, even developed, have been communicated by CALMETTE (13) to the VIth Conférence Internationale de Tuberculose.

* * *

The pathogenic action of the filtrable elements of the tuberculous virus is then exhaustively demonstrated. And the possible passing of these elements through the placenta furnishes us with a key to the complicated riddle about morbid inheritance in tuberculosis.

Still here clinic confirms experimental observation. A great similarity may be found between the morbid frames determined by experimental

inoculation of such elements, and that which represents the former notion of pre-tuberculosis, of lymphatic temperament, of predisposed ground.

Since my first works in 1910 (1) up to those of VAUDREMER in 1921 (14), of VAUDREMER and his co-workers, (15, 16, 17 and 18) in the following years, until the newest ones of the already named authors, one must recognize that the infection determined by the filtrable elements of the virus, is different from the classical tuberculous infection, whose character is chiefly a dystrophic clinical frame, alias the commonest, and causing cachexy, and that, in 8 to 10 o/o of injected animals, according to MALARTRE (19), or a percentage of 3, according to CALMETTE (13) such infection evolves toward the classical form.

ARLOING, DUFOURT and MALARTRE (19) have given a clear exposition of the characters of these forms, and classify them in nodular type, the rarest, cachectic type, the commonest, and an ephemeral curable type, this latter only able to be detected, owing to the transient allergic reaction, revealed by the tuberculin test.

Thus a new field to experiments is open for investigating and determine a relative immunisation of children from tuberculous parents, which would mean a greater resistence to evolution, not only of the virus as also of the disease, creating scrofulous or chronical conditions of the classical forms of the infection.

From the experiences of BOQUET, NEGRE and VALTIS (20) of MAC JUNKIN (21) PARAF (22), of ARLOING, THEVENOT, DUFOURT and MALARTRE (22), we are authorized to conclude to the fact of a certain grade of resistence being bestowed upon the organism of the Guinea pig by the inoculation of the filtrable elements of the virus, to a later virulent infection by the acid-alcohol-fast form.

To support this explanation, there are besides VAN BENEDEN's experiment (24), who obtained in a Guinea pig the phenomenon of KOCH, in consequence of two inoculations of tuberculous extra virus, obtained in two different stuffs (filtrate of pleuretic outspill, filtrate of sputum) and those of VALTIS, SAENZ and MONALDI (25), which also are a confirmation of DEBRE, LELONG and BONNET's (26).

Then, it can be foreseen that: *vaccination of children from tuberculous parents, may be effective, under still undetermined conditions of vaccination dosis renewed in transient or curable forms of the transplancetal infection, by the filtrable elements of the virus.*

* * *

In October 1927, I had an apportunity to report to the First Pan-American Congress of Tuberculosis, held in Cordoba, the first conclusions of the series of experiments, which I detailedly exposed in the first part of the present work.

My opinion is that the experimental facts I observed may be explained as ascribable to the action of the filtrable elements of the tuberculous virus, the same exercising their morbigenous power, provoking the death of the first Guinea pig by cachexy. Inoculated anew to a second animal, the virus determined the formation of a chancre at the inoculation spot

(which contradicts the general observation upon the pathogenic action of the virus), with the regeneration of acid-alcohol-fast forms.

The acid-alcohol-fast forms were re-absorbed. but the satellite ganglion, transported to another Guinea pig, *caused, by two consequent passages, the death of the animal after 5 days.*

On the other part, the morbigenous power of the virus showed itself, once in a first passage, another time in a second passage in the maternal organism, and *after a third passage* in the organism of the fetus, in which always identical lesions were visible: pulmonar infarcts, pulmonar capillar hemorrhages, necrosis and cheesy degeneration of liver, polyadenia and cachexy.

In one case, by a fourth passage, a typical chancre was formed, which cicatrized after one month. *In no incidence was the virulent element found under the shape of acid-alcohol-fast bacillus.*

Everything, in this experimentation happened as if some latent infection were ruining little by little the organic resistence, through lasting functional troubles, which led to the formation of lesions which were easily verified.

This dyscrasic condition was transmissible from the mother to the fetus, thus giving a new confirmation of the notion of *morbid inheritance.* Still an interesting fact results also from the experimental series above referred to, that of having been the tuberculous virus, characterized by the acid-alcohol-fast form, discovered only in such cases, where the infection by the filtrable elements was got at by direct inoculation of the virus.

In cases, where the biologic phenomenon of inheritance interfered, this latter was made patent only by morbigenous power, with the decurring functional and anatomic troubles, without being possible to bring into evidence the *figurative* etiologic element.

This observation demonstrates that *even in cases where the passage of the figurative element of the tuberculous virus* (acid-alcohol-fast bacillus) *from the mother to the fetus* does not effect itself, *the morbid inheritance is made obvious.*

We shall thus have established the notion of pathenergogen, that is to say, of the *morbigenous energy* pertaining to heterologous stuff, and which in the present case is to be dissociated from the notion of ultra virus, this latter being considered as a metacyclic stage of germination of the tuberculous virus, or of the granular form of this virus, which to gather represent an integralizating, biogenic stage in the vital cycle of the KOCH's bacillus.

I consider as the responsible for morbid inheritance in tubercular infection, the morbigenous element accompanying the tuberculous virus, which is not cultivable *in vitro,* nor morphically revealable *in vivo,* but is likely to be transmitted in experimental series by direct inoculation, or by natural passing through the placenta, is droved to exist only by its effects and is also characterized by continuation of these same properties. This is what I called: *pathernegogen.*

CONCLUSIONS

The morbid inheritance from mother to fetus, takes place, in the tubercular infection, by the placenta, allowing in certain most unfrequent cases, the evolution of the etiologic agent up to the known classical form, represented by the acid-alcohol-fast rod; transmitting the potentiality of evolution of this factor, made patent through subsequent passages to sensible organisms, in less rare cases, and bestowing, in much more numerous cases, an atypical tuberculous illness, whose symptoms are changes in the lymphatic system, such as micro-polyadenia, hyperplasia of the ganglia, through infarcts and capillar hemorrhages, necrotic changes in tissues and viscera, and through a deep perturbation of the feeding metabolism which may attain to the extreme degree of causing death.

The functional changes and perturbations, which are characteristics of the atypical tuberculous disease, have been observed by all investigators who have undertaken the problem, even by those who have been led to deny the existence of the filtrable form of the virus, and who considered these symptoms as being the results of a toxical action.

This explanation cannot hold in the case, owing to the fact of these lesions being transmissible by consecutive inoculations, and of they appearing repeatedly, even when the pathogenic element is supplied by an organganism to which it was passed through the placenta, as a maternal inheritance (FONTES) (27).

In tuberculous infection, then, there happens heredo-contagion together with the decurrent morbid inheritance.

BIBLIOGRAPHY

1—FONTES, A.—Memorias do Inst. Osw. Cruz. T. 2—1910.

2—CALMETTE, VALTIS, NEGRE et BOQUET—C. R. Ac. Sc. T. 181 pag. 491 – 1925.

3—ARLOING et DUFOURT—C. R. Ac. Sc. T. 181, pag. 826—1925. Bul. Ac. Med. T. 96, pg. 301—1926.

4—CALMETTE, VALTIS et LACOMME—C. R. Ac. Sc. T. 183, pg. 835 – 1926.

5—SERGENT, DURANT et BENDA—Bul. Ac. Med.—7 Dez. 1926.

6—COUVELAIRE—Presse Médicale 19 Fevrier. 1926.

7—MOENKEBERG, ONETTO e VERGARA—1º. Cong. Pan-Amer. de Tuberculosis. Cordoba Out. 1927. R. Arg.

8—SADAOMI NISHIMOTO - Ref. of the Japan—Med. World. Vol. VII n. 9 Sept. 15. 1927.

9—IVO NASSO—Le Riforma Medica n. 51 Dec. 1927.

10—VAN BENEDEN—Brux. Med. pg. 1493 – 1927.

11—LYDIA RABINOVITSCH KEMPNER—Deut. Med. Woch. Nov. 1927.

12—CALMETTE, VALTIS et LACOMME—Presse Méd. 10 Nov. 1926.—C. R. Acd. de Sc. 186—18 Juin. 1928.

13—CALMETTE,—Rapport à la VI Conf. Int. de la Tuberc. Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXVI n. 20 pg. 889.

14—VAUDREMER—C. R. Soc. Biol. T. 89, pg. 80.

15—HAUDUROY et VAUDREMER—C. R. Sc. Biol. T. 89, pg. 1276.
16—VAUDREMER—Bul. Ac. Méd. T. 95, pg. 440. 1926.
17—VAUDREMER—Le Bacille Tuberculeux 1 vol. Presses Universitaires—1927.
18—VAUDREMER, PUTHOMME et PAULIN—Bul. Ac. Méd. T. 97, pg. 202—1927.
19—MALARTRE—Thèse de Lyon.—Apud. HAUDUROY—Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes.—1 vol. Masson & Cia. 1929.
20—BOQUET, NÈGRE et VALTIS—C. R. Soc. Biol. T. 94 pag. 235—1926.
21—MAC JUNKIN—J. Exp. Med.—T. 33, 751.
22—PARAF—C. R. Soc. Biol.—T. 92, 792.
23—ARLOING, THEVENOT, DUFOURT et MALARTRE—Ac. Méd. 11 Octo. 1927 pg. 208.
24—VAN BENEDEN—C. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1560.
25—VALTIS, SAENS et MONALDI—B. R. Soc. Biol. T. XCIX pg. 1558.
26—DEBRÉ, LELONG et BONNET—C. R. Soc. Biol. T. XCV pg. 1425.
27—FONTES, A.—Communicação á VI Conferencia Internacional de Tuberculose, reunida em Roma Set. 1928.

Infecção do AEDES AEGYPTI macho e possibilidade da propagação da febre amarella de STEGOMYIA a STEGOMYIA sem passagem pelo homem

Pelo Dr. HENRIQUE de BEAUREPAIRE ARAGÃO

Chefe de Serviço

No decurso de nossas experiencias a respeito da febre amarella experimental procurámos verificar si era possivel infectar o *Aedes ægypti* macho com o virus. Como os machos não picam, recorremos, para alimental-os, á sangue desfibrinado de *rhesus* infectado, ao qual addicionavamos um pouco de mel (5-o/o) para tornal-o mais procurado pelo mosquito. Com o sangue assim preparado embebe-se um pequeno tampão de algodão que se colloca na gaiola em que estão os machos *Aedes ægypti*. Estes não tardam a sugar o sangue, não se enchendo, porém, demasiadamente, como ás vezes acontece ás femeas, devido ao seu tubo digestivo ser de menor capacidade e terem menos necessidade de alimento do que aquellas. Depois do primeiro repasto infectante, os mosquitos foram alimentados a mel até o momento da verificação da infecção que foi feita 14 a 16 dias depois.

Até agora, foram feitas 5 experiencias com *Aedes ægypti* em taes condições, que são as seguintes:

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* n. 232. Inoculado em 24-12-28, por via subcutanea, com uma emulsão em agua distillada de 2 *Aedes ægypti*, que, 15 dias antes, tinham picado um *rhesus* infectado. Este macaco, cuja temperatura inicial foi de 38º,9, esteve 5 dias sem febre, no 6º dia apresentou 40º, no 7º 39º,9 e no 8º dia estava cahido na gaiola, com 36º pela manhã; foi sacrificado.

A autopsia revelou uma ictericia muito accentuada, como não occorre geralmente nos rhesus; figado extremamente amarello, baço grande e rins pouco alterados. O exame histo-pathologico não revelou, no figado, as lesões classicas de febre amarella e tão somente degeneração gordurosa.

O *rhesus* (n. 249), inoculado com 1 cc de sangue do *rhesus* 232, teve diversas reacções febris, que não foram devidas ao virus amarillico, porquanto inoculado ulteriormente com sangue virulento, teve uma febre amarella typica e morreu em 6 dias com lesões caracteristicas.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* 412. Foi inoculado em 6-5-29 com uma emulsão de 9 *Aedes ægypti* machos que tinham sugado sangue de *rhesus* infectado nos dias 22 e 23 de Abril de 1929. Este macaco, cuja temperatura inicial era de 38º,9, teve 39º no dia 7; 39º6 no dia 8; 40º,6 no dia 9; 41º,2 no dia 10 e no dia 11 a temperatura pela manhã era de 35º,3 e á tarde 35º. O macaco estava cahido na gaiola e foi sacrificado.

Apresentava lesões macroscopicas typicas de febre amarella, e o exame histo-pathologico do figado, gentilmente feito pelo Dr. MAGARINOS TORRES, demonstrou a existencia de degeneração gordurosa e necrose das cellulas hepaticas e inclusões nucleares especificas.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* 464. Inoculado em 10-6-29 com uma emulsão de 7 *Aedes ægypti* machos que tinham sugado sangue de *rhesus* infectado 403 em 28-5-29. Temperatura 39º. Dous dias depois temperatura de 39º9. E' sangrado. A temperatura mantem-se entre 39 e 39º,7 desde esse dia até 27-6-29. No dia 1-7-29, o macaco está morto na gaiola. Lesões macroscopicas bastante parecidas com as de febre amarella, e o exame microscopico as confirma, demonstrando intensa necrose e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas e inclusões nucleares (M. TORRES).

EXPERIENCIA 4. *M. rhesus* 482. Inoculado no dia 27 com uma emulsão em agua distillada esteril de 2 *Aedes ægypti* que tinham sugado sangue do *rhesus* 408 no dia 28-5-29. Temperatura 38º,9. Até o dia 1º, o animal nada de mais apresenta. No dia 2-7-29, sua temperatura se eleva bruscamente a 40º,7 e no dia seguinte o macaco apresenta-se com 37º,8. E' sacrificado apresentando lesões macroscopicas typicas que são confirmadas pelo exame histo-pathologico que revelou: leve degeneração gordurosa, infiltração de polymorphonucleares em pequenos fócos, inclusões nucleares especificas. Poucas cellulas hepaticas necrosadas (M. TORRES).

Estas 3 ultimas experiencias positivas não deixam duvida que é possivel infectar mosquitos machos, fazendo-os sugar sangue desfibrinado de um *rhesus* infectado. A seguir, fizemos mais as seguintes experiencias com o fim de elucidar se mosquitos machos, collocados com femeas infectadas na mesma gaiola, se infectavam e vice versa.

EXPERIENCIA 5. *M. rhesus* 426. Este macaco foi inoculado com uma emulsão de 7 *Stegomyias* que estiveram com 10 *Aedes ægypti* femeas infectadas numa mesma gaiola de vidro modelo GODOY durante 12 dias. Temperatura em 20-5-29, dia da experiencia, 39º. Até o dia 28, poucas alterações. Neste dia, a temperatura do macaco se eleva a 40º e elle é sangrado. No dia 29 a temperatura cahe a 39º,6, nos dias 30 e 31 o animal tem 40º e 39º,9. Nos dias 1 e 2, 39º,3 e nos dias 3 e 4, 39º,8 e 40º,2. Dahi em deante a temperatura se normalisa, e afinal suspende-se a observação do animal em 13-6-29, tendo elle tido nos ultimos 10 dias, de 39 a 39º,4, salvo no dia 8 em que se elevou a 39º,9.

EXPERIENCIA 6. *M rhesus* 442. Este macaco foi inoculado no dia 29-5-29 com 9,5 cc. de sangue do *rhesus* 426, colhido no dia 28-5-29. Até o dia 8-6-29, a temperatura se mantem pouco elevada, nunca superior a 39º,7. No dia 9, o macaco apresenta bruscamente uma elevação thermica de 41º e no dia seguinte cahe a 36º,8. Elle é então sacrificado. O exame macroscopico das visceras revela lesões de febre amarella que são confirmadas pelo laudo do exame histo-pathologico que diz: congestão; necrose e degeneração gordurosa das cellulas hepaticas; desarranjo das traves de HENLE. Inclusões nucleares (M. TORRES).

Este resultado vem demonstrar que os mosquitos machos, que estiveram 12 dias com 10 femeas infectadas, estavam infectados, porquanto, inoculados em um *rhesus*, provocaram nesse uma molestia attenuada, como se verifica pelo resultado positivo da inoculação do sangue do *rhesus* 426 no de numero 442.

EXPERIENCIA 7. *M. rhesus* 483. Este macaco foi inoculado com uma emulsão de 4 *Aedes ægyptii* femeas que estiveram com *Aedes* machos desde 10-6-29 até 27-6-29, e que estavam seguramente infectados (Exp.

4). (Estes *Aedes* foram collocados juntos numa gaiola nova e limpa no dia 10-6-29, e ahi permaneceram até 27-6-29). A temperatura do macaco era de 39o no dia da inoculação. No dia 28 foi de 39°,1; no dia 29—39°,7; no dia 30—39°; a 1-7-29—39°,9; nos dias 2 e 3 de Julho, 39°; no dia 4—39°,6; no dia 5—40°; no dia 6—40°,9 e no dia 7, a temperatura cahe a 36°, sendo o animal sacrificado. O exame macroscopico das visceras dava todas as apparencias de febre amarella, e o exame histo-pathologico do figado revelou: degeneração gordurosa, necrose das cellulas hepaticas; desarranjo das traves de HENLE; inclusões nucleares. (M. TORRES).

Estas experiencias estabelecem a nosso vêr os seguintes factos:

1o) E' possivel infectar *Aedes aegyptii* macho com sangue desfibrinado do *rhesus* infectado.

2o) E' possivel infectar *Aedes ægyptii* machos collando-os juntamente com femeas infectadas.

3o) E' possivel infectar *Aedes ægyptii* femeas collocando-as juntamente com machos infectados.

Estes resultados parecem afirmar a possibilidade de uma infecção de mosquito o que, provavelmente não é frequente no estado normal, mas que serviria para explicar certos casos de febre amarella que occorrem ás vezes, num logar, muito tempo após o ultimo, e sem que, entre elles, se observem casos intermediarios.

On infection of the male "AEDES AEGYPTI" and the possibility of propagation of yellow fever from STEGOMYIA to STEGOMYIA without passage through man

By Dr. HENRIQUE de BEAUREPAIRE ARAGÃO

Chief of Service

In the course of our experiments with regard to experimental yellow fever, we tried to verify whether it was possible to infect the male *Aedes ægypti* with the virus. As males do not bite, we employed, to feed them, desfibrinated blood of infected *rhesus*, to which we added a little honey (5 o/o), to render it more attractive for the mosquito. With such prepared blood, a bit of cottonwool is humected and placed into the cage where the male *Aedes ægypti* are kept. These begin soon to suck the blood, though not absorbing exceedingly as female often use to do, for, their digestive tube is of a smaller capacity, and they do not require so much food as the latter. After this first infecting meal, the mosquitoes were fed on honey, until the moment of verifying the infection, which was carried out 14 to 16 days later.

Up to the present time, 5 experiments with *Aedes ægypti* were effected under such conditions, a report of which we give hereunder:

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* N. 232. Inoculated on 24. 12. 28, subcutaneously, with an emulsion in distilled water, of 2 *Aedes ægypti*, which, 15 days before, had bitten an infected *rhesus*. This monkey, whose previous temperature was 38°9, remained without a fever for 5 days, showed 40° on the 6th, and 39°9 on the 7th day. On the 8th day, in the morning, it was found lying in its cage with 36° and killed. The autopsy revealed a very marked jaundice, such as seldom observed in *rhesus*, an extremely yellow liver, large spleen, little changes in kidneys. The histo-pathologic examination did not show, in the liver, the typical changes occurring in yellow fever, but merely fatty degeneration.

Rhesus N. 249 inoculated with 1 c.c. of the blood from *rhesus* 232, underwent several febrile reactions, for which, however, the virus of yellow fever was not liable, since after this monkey being later inoculated with virulent blood, it had a typical yellow fever and died after 6 days with the characteristical lesions.

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* 412. Was inoculated on the 6th May with an emulsion made of 9 male *Aedes ægypti* that had sucked on the 22nd and 23rd April 1929, blood from an infected *rhesus*. This monkey, whose temperature, at the beginning, was 38°.9, showed 39° on the 7th; 39°.6 on the 8th; 40°.6 on the 9th; 40°.2 on the 10th May. On the 11th in the morning, temperature had sunk to 35°.3, and 35° at night. The monkey was lying in the cage and was killed.

It showed macroscopic changes, typical of yellow fever. The histo-pathologic examination, for which we are indebted to Dr. MAGARINOS TORRES' kindness, revealed fatty degeneration with necrosis in the hepatic cells, and the specific nuclear inclusions.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* 464. Inoculated on the 10. 6. 29 with an emulsion of 7 male *Aedes ægypti* which had sucked on the 28. 5. 29, blood of the infected *rhesus* 408. Temperature 39o. After two days, it had risen to 39o.9, being then the animal bled. Temperature keeps between 39o and 39o.7 from this date till on the 27th June. On the 1st July, the animal is found dead in its cage. Macroscopic lesions, rather similar to those of yellow fewer, same being confirmed by microscopic examination, which shows, besides, extensive necrosis and fatty degeneration of the liver cells, as also nuclear inclusions (M. TORRES).

EXPERIMENT 4. *M. rhesus* 482. Inoculated on the 27th with an emulsion, in sterile and distilled water of 2 *Aedes ægypti* which had sucked blood from *rhesus* 408 on the 28. 5. 29. Temperature 38o.9. No change in the animal until the 1st of July. On the 2nd, sudden rise of temperature to 40o.7, and on the next morning, it sinks back to 37o.8. Being killed, it shows macroscopically typical lesions, confirmed by histo-pathologic examination, which reveals, besides, a slight fatty degeneration, infiltration of polymorphonuclear leucocytes and nuclear inclusions. Few liver cells being necrosed (M. TORRES).

The last three positive experiments do not leave place to any doubt about the possibility of infecting male mosquitoes by putting them to suck disfibrinated blood from an infected *rhesus*.

We realized further experiments, with a view to elucidating the question whether male mosquitoes, put together with infected females in the same cage, could get infected, or vice versa.

EXPERIMENT 5. *M. rhesus* 426. This monkey was inoculated with and emulsion of 7 *Stegomyiæ* which had remained in a glass cage of GODOY, for 12 days time, together with 10 infected females. Temperature on the 20. 5. 29 (date of the experiment), 39o. Up to the 28th, no noteworthy changes. By that day, the temperature of the animal rose to 40o, this being then bled out. On the 29th, temperature decreases to 39o.6. On the 30th and 31st, it shows 40o and 39o.9. On the 1st and 2nd, 39o.3 and on the 3rd and 4th, 39o.8 and 40o2. Henceforth, temperature is getting back to normal; the observation of the animal was given up on the 13. 6. 29, the same having shown, during the last 10 days, 39o to 39o.4, except on the 8th, when it rose to 39o.9.

EXPERIMENT 6. *M. rhesus* 442. The animal was inoculated on the 29. 5. 29 with 0,5 cc. blood from *rhesus* 425, gathered on the 28. 5. 29. Up to the 8. 6. 29, temperature remains about unchanged, never exceeding 39o.7. On the 9th, a sudden thermic rise to 41o, falling on the next morning to 36o.8. The animal is then sacrificed. The macroscopical examination reveals lesions of yellow fever, which the results of histo-pathologic examination confirm, say: congestion, necrosis and fatty degeneration of liver cells, alterations in HENLE's trabeculae. Nuclear inclusions (M. TORRES).

This result shows to evidence that the males, which had been for twelve days together with ten infected females, were also infected, for,

when injected to a *rhesus*, they determined in it a weakened disease, as was verified from the positive results of the inoculation of blood from *rhesus* 426 to *rhesus* 442.

EXPERIMENT 7. *M. rhesus* 483. This monkey was inoculated with an emulsion of 4 female *Aedes ægypti*, which were left together with male *Aedes* from the 10. 6, 29 to the 27. 6. 29, and were undoubtedly infected (4th experiment). (These male and female *Aedes* had been put on the 10. 6. 29 together into a clean cage and remained there until the 27. 6. 29). The monkey's temperature was 39o on the day of the inoculation; on the 29th, 39o.7; on the 30th, 39o; on the 1st July, 39o.9; on the 2nd and 3rd, 39o; on the 4th 39o.6; on the 5th 40o; on the 6th 40o.9, falling on the 7th to 36o, being then the animal killed. Macroscopical examination of the viscera confirmed the true aspect of yellow fever, and the histo-pathologic examination revealed: fatty degeneration, necrosis of the liver cells, alterations in HENLE's trabeculae, nuclear inclusions. (M. TORRES).

In our opinion, these experiments are a support to following facts:

1) it is possible to infect male *Aedes ægypti* with disfibrinated blood from an infected *rhesus*;
2) it is possible to infect male *Aedes ægypti* by putting them together with infected females;
3) it is possible to infect female *Aedes ægypti* by putting them in contact with infected males;

These results seem to us to be the confirmation of a possible infection of mosquitoes, which under normal conditions, is probably not frequent, but which might perhaps account for the explanation of certain cases of yellow fever, which sometimes occur on a place, a long time after the last incidence, without having, during the time elapsed, any intermediate case been observed.

The seminal vesicles of the castrated mouse, test for the testicular hormones (1)

By THALES MARTINS, M. D., and A. ROCHA e SILVA

For some eight months past, we have been going into the question of tests for testicular hormones. Our object was chiefly to study the changes in seminal vesicles of white mice, as their atrophy after castration is a well known fact. (STEINACH (1)). We had in view determining which were the earliest changes found after gonadectomy; this being ascertained, the second part of our task was to investigate whether these changes might be reversible under the influence of injections of an active substance.

One may say that, as a rule, the atrophy of seminal vesicles in castrated mice easily allows, after 9 to 11 days, to detect a castrated from a normal mouse.

Normally the mucosa is covered with multiple villosities anastomosed in some spots. The cells are of the cylindrical type, the nucleus being situated at the basis of the cell.

The cytoplasm is rich in granulations. The lumen of the vesicle is filled with a viscous fluid, of milky appearance. We never found spermatozoids in the vesicles of normal white mice.

Five days after the castration, the morphologic changes are quite visible: reduction of the cytoplasm, nucleus in the centre of the cell.

The cytologic structure is modified; GOLGI apparatus, secretion granules. The cells assume a cuboidal shape, and the granulous aspect of the cytoplasm disappears, becoming homogenous. After a longer time, these changes become increasedly marked; the villosities lose their characteristic appearance and atrophy themselves.

The contents of the vesicles pass gradually to form a transparent fluid. The changes in the prostate, in the deferent canal and the penis do not present equal interest; therefore we leave them aside.

After having castrated more than 200 mice, of which we examined more than 115, we have come to the conclusion that the macroscopic sizes of the vesicles and cytological changes constitute a satisfactory test with regard to testicular hormones.

We are endeavouring to make it easier, by simplifying the histological technique, in order to get by means of dissociation or smearing, a ready verification of cytological changes, avoiding the long manipulation of inclusion, cuts, etc., of the material.

The best fixating mixtures are those that contain osmic acid.

(1) Received for publication July 31st, 1929.

MEASURES

We note preferably the maximum length and width ; the product of both (L × H) gives an empirical number, which we shall admit to represent a size index, the same as Mc GEE (2) did for the capon comb. The weight is not so reliable an element. Numerous are the causes of errors. MUTO (3), who used to note the weight of associated glands as a guide for his researches on testicular hormones, reports most varying results.

Atrophy is more regular in still young specimens weighing 17 grams more or less. In such animals, we found, as a rule the length about 14 mm., and width 3,7 to 4,5 mm., and the index (L × H) 53 to 63).

In castrated animals, the vesicles, measured by the 10th to the 13th day after the operation, show an index in the vicinity of 20, not seldom under 10.

RESULTS OBTAINED BY INJECTION OF EXTRACTS.

These facts being established, we undertook then, to verify the influence of the injections of extracts. The injections were effected from the day immediate to castration, during a period of 5 to 10 days. One understands easily that the threshold to prevent atrophy taking place, should be lower than that necessary to regenerate an organ already in complete involution.

We used at the beginning suspensions or macérations of freshly extirpated testicles of mouse and rat. The results were not bright at all. Even when we injected subcutaneously to the animal, its own testis extirpated on the spot, the vesicles after 10 days were hardly distinguishable from the uninjected controls. We further injected testicular lipoids of bull and goat. We succeeded thus in obtaining unquestionable results: not only the cytoplasmic granulations were still richly prevailing, as also the size of the organ was, as an average, by 100 o/o higher than in controls.

With active extracts, we obtained index numbers up to 60, whilst the highest index for controls was 23, and together with this, the complete maintaining of the normal cytological appearance.

We may conclude that the intended test is quite satisfactory, and may be adopted, as long as no better one is proposed. Taking it as a basis, we shall admit as unit for testicular hormones (at least the hormone that has an influence on accessory glands), the smallest quantity which, when injected daily for a period of 10 days, keeps the seminal vesicles of the castrated white mouse at a level close to the normal, so as to keep the cellular characters of the gland unchanged, and to obtain for an index as described above, a number at least higher by twice than that found in the castrated controls of same weight and time of castration. This will prevent remaining within the limits of possible errors.

Of course, by further study, other details may be established, which will allow of an easily reaching a simple standard.

Ours is at least easier and quicker than the test of capon comb, chiefly used by Mc GEE, and of spermatozoid motility of MOORE (4) which seemed to be, up to now, the most reliable.

We presently used the test of seminal vesicles, not only in view of

the question of testicular extracts, but also for the study of other connected problems.

With implantations of the fore-lobe of the hypophysis of rabbit, effected twice a week, during a period of 2 to 3 months, in very young or normal adult mice, it is not possible to obtain in the animals, an index higher than the normal.

One may observe that they reach sizes and a structure rather approaching the maximum figures found in normal animals.

Also by a longlasting series of injections of hypophyseal extracts from pregnant women urine, the results are the same.

This is a coutribution to the study of the "law of all or nothing" as described by PEZARD (5), in fowl, and by LIPSCHÜTZ (6), in rodents.

Noteworthy is the fact that, when one or both epidydimides are left in the gonadectomized animals, the atrophy of the vesicles is delayed in many cases.

This does not happen in all cases, but is frequently observed. We understand it as representing a storage of testicular hormone, which is reabsorbed after the castration. It is obvious that care was taken, not to leave testicular fragments sticking to the epidydimis.

Our observations were ready for printing, when we received yesterday the "American Journal of Physiology" LXXXIX, N. 2, containing an article from MOORE and GALLAGHER "On the prevention of castration effects in Mammals by Testis Extract Injection".—These authors summarize in castrated rats, the cytological changes of seminal vesicles found after 5 to 20 days after the gonadectomy, as follows:

"We have found readily apparent cytological changes within 5 to twenty days after castration, involving regression of the secretory epithelium, loss of individual and constant elements of the cells of the normal tissue and changes in GOLGI bodies. On the basis of the cytology of the seminal vesicles, one can easily detect a ten days castrated animal; by injecting adult rats subcutaneously with testis extract, beginning immediately after operation, we have prevented the development of the typical castration changes in the seminal vesicles; animals castrated for twenty days, but uninjected, have both smaller seminal vesicles than they had at the time of operation".

"We have thus prevented the development of all the typical cytological castration changes by injection of the testis extract. Furthermore, we have produced, cytologically, normal seminal vesicles in animals that were prepubertally castrated and hence had not developed the typical normal vesicle until after being injected with the extract".

The mentioned abstracts are those connected with our own work. By reading it, we may not conclude from the mentioned work, which were the characteristics adopted for the test so as to establish a standard, viz.: age of animals, limit of duration of the injections, in the incidence of quantity to be used.

We believe mouse a most practical material for this kind of work. We preferred it, because the phenomena of regression appear earlier, and owing to its higher sensibility, being of a smaller weight, about one fifth lighter than the rat.

Some points of the present work will be further and more accurately developed in notes to be read at the next meeting of the Sociedade Brasileira de Biologia, and to be published in the Comptes Rendus de la Société de Biologie de Paris, and more extensively elsewhere.

The enclosed plates show examples of our own results.

It is a great pleasure to us that, independently of MOORE and GALLAGHER, we have been able to arrive, with mice, to results which, in general lines, are concordant with those obtained in rats by those eminent specialists.

Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute.

Manguinhos, 30th July, 1929.

BIBLIOGRAPHY

1—STEINACH—Pflügus Arch., 56, 1894.
2—Mc GEE, JUHN and DOMM—Am. J. Phys., 87, 406.
3—MUTO—Act. med. Keijo, 11, 125, 1928.
4—MOORE—J. exp., zoology, 1, 455, 1928.
5—PEZARD—J. Physiol. Path., gen., 700, 1922.
6—LIPSCHÜTZ—The int. secret. of sex glands.

Homenagem á memoria de OSWALDO CRUZ

Com a presença da Exma. viuva OSWALDO CRUZ e filhos, do Ministro do Uruguay, Sr. RAMOS MONTERO, dos membros da delegação Uruguaya aos Congressos medicos commemorativos do 1º centenario da Academia Nacional de Medicina, da Caravana Medica Uruguaya, de innumeros congressistas sul-americanos, acompanhados de suas familias, e de todos os technicos do Instituto Oswaldo Cruz, foi inaugurada no dia 6 de Julho do corrente anno, no "hall" do 1º andar do edificio principal desse Instituto de Manguinhos, a placa de bronze que a Faculdade de Medicina de Montevidéo lhe offereceu, como uma homenagem á memoria de OSWALDO CRUZ.

Entregou a artistica dadiva o Sr. Professor JOSÉ LUIS SCOSERIA, Presidente da Delegação Medica Uruguaya, que proferiu o seguinte discurso:

"Señores".

La Facultad de Medicina do Montevidéo ha querido exteriorizar en fórma perdurable—en el bronce votado a la Gloria—la admiración y el respecto que la clase medica y todos los uruguayos sienten por el eminente sabio creador de este Instituto y nos ha confiado el alto honor de entregaros esa placa recordatoria que habeis tenido la gentileza de fijar en el muro de este augusto templo de la ciencia.

OSWALDO CRUZ libró a Rio de Janeiro del flajelo de la fiebre amarillia que hacia medio siglo era asolado por frecuentes empujes epidemicos que disimaban su población. En estas palabras se sintetiza generalmente la obra del saneamiento de Rio.

Recordemos las condiciones en que se efectuó.

Estabamos en el verano de 1903—dice ACEVEDO SODRÉ—pagando el tributo habitual al flajelo que nos enlutaba y humillaba, cuando el Presidente RODRIGUES ALVES confió la dirección general de los servicios de Salud Publica a OSWALDO CRUZ. Todos lo conociamos como un joven intelligente y aplicado a los estudios de laboratorio, que habia sido brillante su pasaje por la Facultad en al que conquistó la simpatia y el aprecio de sus maestros, que habia cursado con gran provecho las aulas del Instituto Pasteur, que habia publicado trabajos de valor en su especialidad, pero siempre fué tenido como modesto, circumspecto y aparentemente timido. Nadie lo creyó con las amplitudes necesarias para dirijir una gran campaña.

Aceptó el alto puesto que se le confiaba, formuló desde luego el plan de la lucha que iba a emprender, exijió de los poderes publicos amplia autonomia y los recursos necesarios y asumio el compromiso de extinguir la fiebre amarillia en pocos años.

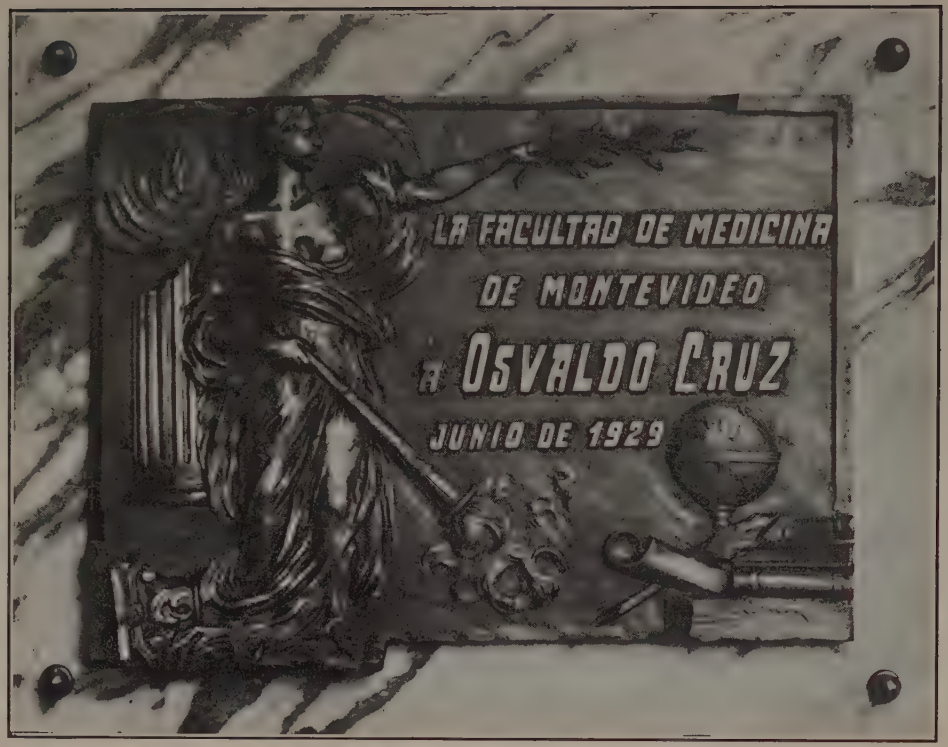

LA FACULTAD DE MEDICINA
DE MONTEVIDEO
A OSVALDO CRUZ
JUNIO DE 1929

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Figs. 1, 2 e 3—Differentes aspectos da inauguração da pedra fundamental do Monumento a OSWALDO CRUZ, na Avenida das Nações, Rio de Janeiro, em 5 de Julho de 1929.

De acuerdo con las idéas de FINLAY y siguiendo el ejemplo norte americano del saneamiento de la Habana, revolucionó las practicas hijienicas entonces corrientes, iniciando contra el mosquito la campaña antiamarillica. La nueva orientación dada a los servicios de Higiene Publica y la severidad con que eran aplicadas despertaron la mas violenta oposición; y tuvo que luchar no solo contra el mosquito sinó tambien contra peores enemigos: la ignorancia, los prejuicios, los intereses privados. Y la lucha fué formidable; la oposición revistió á veces fórmas de asonada y hasta llegó a peligrar su vida. Pocos eran los que lo defendian. La mofa, el escarnio, el desden, todas eran armas buenas para combatirle; su promesa de extinguir la fiebre amarillia en pocos años era calificada como una *fanfarronada de mozo audaz y inexperiente.*

Y aquel hombre de imperturbable energia que parecia tinido, no se defendia, no recriminaba, no atacaba a sus detractores, no discutia, inculcaba su fé y su paciencia a sus auxiliares afirmando siempre que su respuesta seria la extincion de la fiebre amarilla que ya sentia cercana.

Ante esta oposicion implacable, ante esta lucha despiadada, OSVALDO CRUZ proseguia su obra con inquebrantable tenacidad, seguro del exito: la disminución progresiba de la fiebre amarilla sonaba como clarinada de victoria.

Permitidme señores, que termine estas palabras con un recuerdo personal que constituye una de las grandes emociones de mi vida.

El dia 3 de Agosto de 1909 presidia yo la seccion de Higiene del IV Congreso Medico Latino Americano que se celebraba en esta ciudad. OSVALDO CRUZ a quien yo no conoci hasta aquel momento tomo asiento frente a la mesa directiba con la timidez, con la modestia y la sensillez que eran sus mas salientes caracteristicas personales y dió lectura a una memoria tributada *Prophylaxia da Febre Amarella.*

Era la descripción de la campaña ante-amarillica iniciada el 20 de Abril de 1903 y que habia dado como resultado la extinción de aquella enfermedad; pues en el 1o semestre de 1908 solo se habiam producido 4 casos (1 en Marzo y 3 en Enero) habiendo por consiguinte transcurrido ya un año sin que se hubiera producido ningun caso nuevo. Era un triunfo, expuesto con la mayor sencillez, sin una frase que aludiera a la importancia del trecho y a sus transcendencias, sin una palabra ni alusion alguna de reproche á nadie. Asi era aquel Grande.

El Dr. LOZANO, delegado argentino, propuso un voto de aplauso y todos de pié aplaudimos largamente el triunfo de le ciencia, del sabio y del hombre superior.

Dos dias, despues, el 5 de Agosto en un dia radiante como el de hoy, tenia lugar en este mismo sitio, una cerimonia tocante.

Por iniciativa del Brasil Medico, la clase medica brasilera habia resuelto rendir publico y solenne homenage al eminente colega Dr. OSVALDO CRUZ por el relevante e inolvidable servicio prestado a la patria extinguiendo la fiebre amarilla de Rio de Janeiro.

A ese homenaje se adherieron todas las delegaciones de las republicas sud-americanas que habian concorrido al Congreso. Todos nos sentimos solidarios del homenaje, que fue un homenaje continental. En ese dia OSVALDO CRUZ cumplia 35 años y le fue entregada una medalla conmemorativa del acto.

El Dr. AZEVEDO SODRE hizo el elogio, del hombre, del sabio y de su incomparable elocuencia entregandole la medalla. Al terminar el discurso fueron incesantes y unisonos los aplausos y las aclamaciones al Doctor OSVALDO – como cariñosamente se le llamada—sobre cuya cabeza cayó durante algun tiempo una lluvia de petalas de flores arrojadas por todos los concurrentes, que lo rodeabamos. Todos los jefes de delegación tejimos elogios al homenajeado con mas o menos elocuencia, pero todos con igual sinceridad y entusiasmo.

OSVALDO CRUZ presa de grand emoción agradeció el homenaje haciendo extensivo a sus colaboradores, a quienes—con su habitual modestia—atribuyó la mayor parte de los exitos por el alcanzados.

En estas carillas no he pretendido hacer la biografia de OSVALDO CRUZ. Ella está escrita con profundos rasgos en la historia cientifica del Brasil y todos en el Brasil y en la America la conocen. Solo me he referido a su obra mas proficua a la que mayor muestra sus grandes virtudes y condiciones de hombre de ciencia y de patriota, la que lo senala al respeto y a la admiración de la humanidad.

Asi era el hombre que fundó, creó y organizó este Instituto, verdadera usina cientifica de donde ya han salido miles de memorias y estudios sobre los mas arduos y complejos problemas de las ciencias biologicas.

Los grandes hombres, los benefactores de la humanidad, no mueren, viven en sus obras y este Instituto que con toda justicia lleva el nombre de OSVALDO CRUZ es el mas digno y el mas grande monumento a su memoria; aqui perduran sus enseñanzas y el recuerdo que consagra será siempre estimulo y fuente de energias, para la actual y las futuras generaciones de trabajadores que alli andan en busca de enseñanzas, por eso la Facultad de Medicina de Montevidéo quiere que en el figure en forma indeleble el homenaje que reverentemente tributa al sabio, al patriota al grande OSVALDO CRUZ, gloria del Brasil y del a America Latina".

O Director, interino, do Instituto, Dr. ALCIDES GODOY, agradecendo a distincta e carinhosa homenagem, proferiu as seguintes palavras:

"Srs. Delegados do Uruguay.—Meus senhores.—Mais uma vez manifestaes, de modo tão grato para nós, a vossa admiração por OSWALDO CRUZ; assim sois constantes em vossa amisade o que muito vos dignifica.

Sois justos para com os desapparecidos, o que é tão raro, mais que dos vivos vos lembraes dos mortos, e que tanto vos exalta.

Somos felizes por ter tido desde sua fundação neste Instituto, uma só norma. Tão elevado foi o padrão deixado por OSWALDO CRUZ, que a unica e grande difficuldade é de conserval-o, não desmerecendo as tradições herdadas.

Este Instituto com as lembranças que tendes delle, e com a vossa bondade, outra cousa não quereis senão mais uma vez manifestal-as, guarnecendo-o com as obras de arte que nos offereceis, fica de qualquer modo sendo integrado ao vosso paiz e a placa que inauguramos é uma representação material dos laços espirituaes que já nos uniam.

OSWALDO CRUZ foi na Sul-America um precursor, criando, a cellula mater de instituições congeneres a esta, que tanto honram a mentalidade dos latino-americanos, e no momento actual não vemos senão a grandeza de

vosso reconhecimento que reflecte a maior elevação de vosso espirito e coração.

Terminando senhores, eu desejaria que ao mesmo tempo que inauguramos esta placa, voltemos ao passado e, num esforço de imaginação para vós outros e de emoção para nós, vejamos não os bronzes ou os marmores, nem o busto de OSWALDO CRUZ que ali está sobre um pedestal de granito representar a realidade, mas sobre as pedras que formam hoje a base deste Instituto, outrora rusticas e esparsas por este mesmo local, invoquemos a figura de OSWALDO CRUZ em descanço após fatigante jornada; essa figura, tão familiar a todos, contemplaria o horizonte desapparecendo em um rapido crepusculo tropical, o semblante tranquillo, os olhos de quem accordando sonha, respirando em um mundo de esperanças. . . e depois a noite. . .

Noite que nos envolve e a qual quereis com a vossa amisade tornar menos escura, trazendo a claridade de vossa solidariedade, que symbolizaes nesta recordação.

Falou tambem um membro da Caravana Medica Uruguaya, sendo todos os discursos muito applaudidos pela selecta assistencia.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

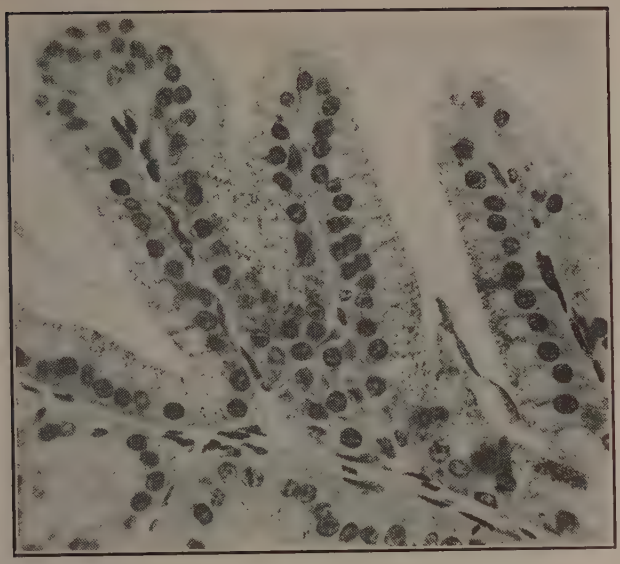


Fig. 1—Seminal vesicle of normal adult white mous. 1:600

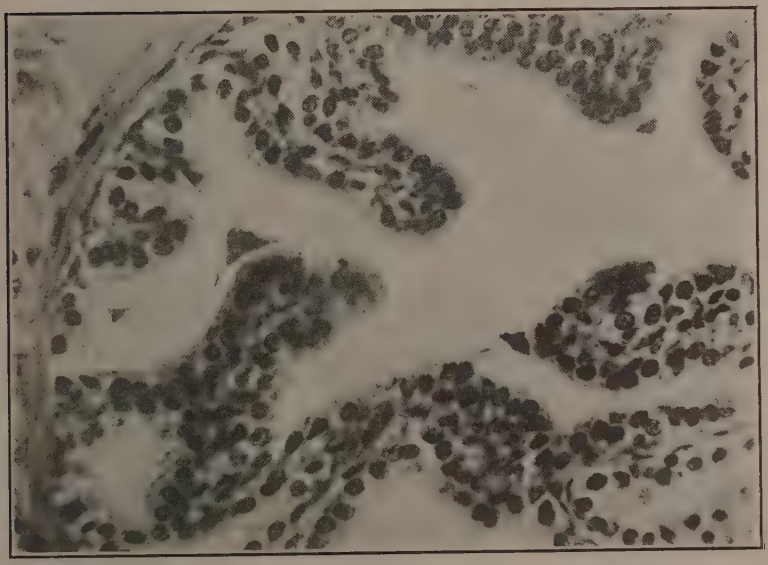


Fig. 2—Seminal vesicle of adult mous, 11 days after castration. 1:600

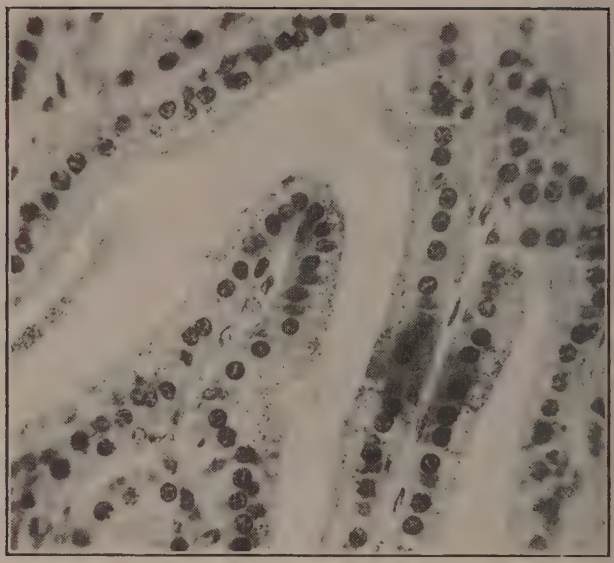


Fig. 3—Seminal vesicle of adult mous, 11 days after castration and injection of lipin extracts of goat testis. 1:600

1 2 3 4

Fig. 4—Vesicles of 17 grs. mice, same litter.

1—normal.
2 and 3 - 11 days after total castration.
4—11 days after castration, with conservation of the epididymis.

SAPROPHYTISMO DO BACILLO TUBERCULOSO (1)

Pelo Dr. A. FONTES

Chefe de Serviço do Instituto Oswaldo Cruz

A noção de *saprophytismo* deve ser encarada sob diversos aspectos no estudo do bacillo de tuberculose: sob o aspecto classicamente admittido, noção microbiologica, sob o aspecto de avirulencia para o hospedeiro, noção pathogenica, sob o aspecto de reversibilidade de caracteres que permitta classificar o agente da infecção tuberculosa como originario de uma fonte unica, ponto de partida de typos apathogenos, symbioticos, ou virulentos, noção phylogenetica.

I

Existe o bacillo da tuberculose em vida saprophytica no meio exterior?

A tendencia natural do espirito é crer que as especies actualmente pathogenicas ter-se-iam adaptado á vida parasitaria; umas incompletamente, podendo ainda exercer a funcção ordinaria e só vivendo como parasita occasionalmente; outras que, por se terem de tal sorte adaptado á vida parasitaria, perderam a faculdade de viverem nas condições do meio exterior, senão completamente, ao menos, quasi que por completo. Estas especies só em condições especiaes podem viver em condições de vida saprophytica, no sentido micro biologico, isto é, sujeitas ás vicissitudes do meio exterior.

O estudo da flora microbiana saprophytica revelou a existencia de uma classe de microorganismos, morphologicamente semelhantes ao bacillo de KOCH e como elle caracterisados pela estructura particular que lhes confere a propriedade de acido-resistencia.

Esta classe, conhecida ainda como a de germes para-tuberculosos, mostra representantes no solo, nos vegetaes, em productos animaes diversos; e se, acaso ficasse demonstrada a capacidade tuberculigena, de qualquer d'essas especies, não só o problema microbiologico como o medico e o hygienico, referentes á infecção tuberculosa, muito se esclareceria.

As verificações orientadas neste sentido por contraditorias ainda não fizeram praça.

As experiencias de KOLLE, SCHLOSSBERG e PFANNESTIEL (1) que inoculando bacillos saprophytas acido-resistentes e bacillos tuberculosos de animaes de sangue frio, conseguem em inoculação intra-peritoneal em cobayas, por passagens successivas, determinar a infecção tuberculosa generalisada, as de JOSEF IGERSHEIMER e H. SCHLOSSBERGER (2) que inoculando bacillos para-tuberculosos na camara anterior do olho em cobayas obtiveram lesões graves, semelhando ás produzidas por bacillos tuberculosos; ás de SAN FELICE (3) que conseguiu infecções tuberculosas ty-

(1) Memoria apresentada ao 2o. Congresso Pan-Americano de Tuberculose, reunido no Rio de Janeiro de 30 de Junho a 7 de Julho de 1929.

picas, partindo de um streptotryx acido-resistente, isolado de um rato, acham contradicta nas experiencias de BRUNO LANGE (4) com acido-resistente dos instrumentos de sopro, de BRUNO HEYMANN e WALTER STRAUSS (4) e de DAL COLLO (6).

MAHER (7) refere entretanto ter isolado de um abscesso traumatico do escroto um bacillo acido-resistente com os caracteres do bacillo de smegma que, por passagem em batata caldo glycerinado em estufa, ao cabo de 3 semanas originava pequenas colonias com aspecto de colonias do bacillo da tuberculose do typo humano.

Essas colonias deram por infecção da cobaya por via intra-peritonial o quadro de tuberculose generalisada, transmissivel em serie.

O caso clinico terminou 6 mezes depois por morte em virtude de tuberculose pulmonar, activa, inexistente clinicamente, por occasião de infecção do escroto.

CALMETTE (8) com BOQUET e NÉGRE não conseguiram mesmo depois de 10 passagens em cobayas e coelhos, augmento de virulencia de uma amostra de *phléole*, de MOELLER, nem tampouco a capacidade de determinar a formação de tuberculos; verificaram entretanto, que, após as passagens pelo organismo animal, a amostra em questão se cultivava mais facilmente á temperatura de 37°C. e que determinava o phenomeno de KOCH em cobayas tuberculosas, apezar de não exercer nenhum poder protector em relação ás inoculações subsequentes do bacillo tuberculoso.

Resulta entretanto ainda da observação de grande numero de observadores que a condição de pathogeneidade pode ser, ainda que accidentalmente, apresentada pelos acido-resistentes banaes, ou para-tuberculose. Assim concluem PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON (9), e mesmo reacções biologicas tem sido evidenciadas que aproximam os para-tuberculose dos bacillos tuberculosos verdadeiros.

A para tuberculina de IRIMESCO (10), a funcção antigenica evidenciada por OGAWA (11), o estudo da biologia de differentes amostras (COURMONT, CANTACUZENE, DESCOS, RODET e GALAVIELLE (12) fallam sobre a possivel ligação de parentesco entre as bacterias acido-resistentes banaes e o bacillo de KOCH.

Se em verdade não poude ser ainda evidenciada nitidamente a funcção pathogena tuberculigena de acido-resistentes saprophytas, de sorte a permittir ligação phylogenetica clara entre elles e os bacillos da tuberculose, pode-se entretanto affirmar que: *condições especiaes podem agir sobre estes ultimos transformando-os em typos cada vez mais proximos ao dos acidos-resistentes banaes, por modificações profundas de sua biologia tornando-as avirulentas, alterando-lhes o bio-chinismo de sorte a perderem as principaes caracteristicas dos bacillos pathogenos, em estreita relação com a vida do parasitismo obrigatorio.*

As antigas verificações de AUCLAIR (13) fallam ainda em favor desta these.

Observações muito interessantes acabam de ser communicadas por LEON KARVACKI (14) á Sociedade Poloneza de Biologia. Possue KARVACKI dez amostras de bacillos tuberculosos que germinam e se desenvolvem em culturas á temperatura ordinaria. Quatro realisam o quadro saprophytico completo: facil desenvolvimento em meios communs, á tem-

peratura ordinaria, avirulencia por os animaes de laboratorio, funcção chromogena accentuada. Estas amostras de origem humana e de origem equina apresentam ainda profundas modificações do seu metabolismo cultural; alteração e enfraquecimento em algumas de poder fermentivo, cheiro pronunciado de trimethylamina, producção de tuberculina fraca. As outras 6 amostras apresentam ainda lacunas em seu saprophytismo.

Apezar de se desenvolverem a temperatura ordinaria, o seu desenvolvimento é lento e só se faz em meios proprios á tuberculose. Algumas dellas são já apathogenas para a cobaya.

As observações que desde 1923 venho fazendo nesta ordem de idéas fallam eloquentemente em favor do possivel saprophytismo do bacillo da tuberculose. Não me furto a transcrever o que com BARBOSA DA CUNHA (15) publiquei, para melhor entendimento das conclusões.

* * *

"Culturas de tuberculose aviaria, e bovina, antigas no laboratorio, com 5 mezes de desenvolvimento em gelose glycerinada á 5 o/o, foram transplantadas em 5-VII-23, para meios de SABOURAUD-maltosado e meio de SABOURAUD-maltosado-glycerinado á 5 o/o. As culturas se desenvolveram abundantemente nos tubos com o meio glycerinado e foram pouco abundantes nos tubos isemptos de glycerina. As amostras semeadas se comportaram igualmente, não sendo possivel estabelecer differença apreciavel no desenvolvimento das respectivas colonias, quando comparadas nos mesmos meios de cultura. (Observação feita em 11-XI-923).

N'esta ultima data se procedeu a uma nova passagem nos mesmos meios, tendo sido observado um mez depois culturas mais abundantes que da primeira passagem. Estas culturas foram conservadas até Abril de 1924, quando iniciamos a verificação por novas series utilisando-nos das amostras mais antigas da collecção do Instituto. Dentre estas sobreleva notar a amostra T. M. 1 (typo humano) que nessa occasião contava cerca de 25 annos de passagens successiva em meios artificiaes, sem passagem em animal e que conservava toda a virulencia e caracteres morphologicos e culturaes classicos.

Não só essa amostra como ainda outra do typo humano (T. M. 4) e outras do typo bovino foram mantidas por passagens successivas em meios de SABOURAUD-maltosado, glycerinado-glycosado-maltosado, glycerinado-glycosado, conservação, conservação-glycerinado e gelose-glycerinada, até Outubro de 1924, sem que fossem notadas differenças accentuadas no desenvolvimento das culturas, nem na virulencia das amostras.

Pelos exames repetidos essas amostras conservaram sempre sua morphologia em bastonetes mais ou menos granulosos, sua acido-resistencia mais ou menos accentuada e sua virulencia sem modificação apreciavel. O mesmo succedeu em culturas mantidas por passagens repetidas em meios liquidos de composição identica ao SABOURAUD (com exclusão de gelose) e no meio usado para o preparo da vaccina do carbunclo symptomatico, immensamente favoravel á attenuação desse germem, e que é constituido pelo caldo de carne, sôro de cavallo e glycose.

Ainda ahi as amostras de tuberculose semeiadas se desenvolveram sem attenuação apreciavel de sua virulencia e sem modificação sensivel na sua morphologia e caracteres culturaes. (Observações feitas em 8 de Setembro de 1924).

Alguns dos tubos de cultura em SABOURAUD-maltosado, glycerinado-maltosado e glycosade-maltosado foram deixados fóra da estufa em exposição á luz diffusa, arrolhados com rolha de cortiça, sem nenhuma repicagem. Assim de Agosto de 1924 a Novembro de 1926 permaneceram essas culturas, quando foram então repicadas para novos tubos de SABOURAUD. *A semente não se desenvolveu nos tubos repicados, que foram conservados na estufa durante 45 dias.*

Addicionou-se então um pouco de caldo simples aos tubos originarios e foram elles mantidos em estufa até Fevereiro de 1927. Nessa data a amostra T. M. 1, semeada em SABOURAUD-glycosado em 29-VIII-24, repicada novamente deu desenvolvimento a culturas pujantes de bacillos de tuberculose, alcool-acido-resistentes.

Em 6 de Janeiro de 1928, procedeu-se a uma nova transplantação da semente do tubo original T. M. 1., semeada em Agosto de 1924, tendo havido abundante desenvolvimento em todos os tubos semeados.

A vitalidade da semente no meio de SABOURAUD- glycosado se mantinha ainda, após 3 annos e 5 mezes. As outras amostras não mais se desenvolveram.

As experiencias acima referidas demonstram *a possibilidade do bacillo da tuberculose manter-se em estado de vida latente em culturas artificiaes durante o praso de 2 annos e 7 mezes, recobrando a sua virulencia (na acepção da capacidade* de *reproducção) sem* perder os *seus caracteres morphologicos e culturaes, bastando para isso encontrar elementos* favoraveis ao seu desenvolvimento: CALOR, ELEMENTO NUTRITIVO E HUMIDADE.

* * *

Essas experiencias conduziram o nosso espirito á verificação da possibilidade de vida do bacillo da tuberculose em condições proximas ao saprophytismo natural. Para esse fim estabelecemos a seguinte serie experimental, cujo protocollo damos a seguir:

21 de Março de 1927—Foram semeados 2 balões de caldo glycerinado a 5 o/o em superficie com cultura em pelle de T. M. R. (amostra isolada de urina de homem, typo humano); 2 balões com cultura em pelle de T. H. A. (typo humano, isolado de escarro).

Os balões foram conservados á temperatura ambiente e expostos á acção da luz diffusa.

Na 1a semana todas as pelles semeadas foram ao fundo dos balões.

5-5-927—Em um dos balões semeados com T. M. R. (balão 1) a semente que fora ao fundo serviu de nucleo ao desenvolvimento de uma cultura de cogumelo (observação feita 48 dias depois da semeadura).

22-6-927 – Nessa data um fragmento da semente do balão 1, que accarretava comsigo uma particula de cultura do cogumelo, emulsionado em um pouco dagua physiologica, foi inoculado em 2 cobayas.

Estas cobayas apresentaram cancro e ganglios correspondentes infartados no prazo commum.

22-8-927—Nessa data foi extrahido um ganglio inguinal de uma das cobayas. Esfregaços do ganglio mostraram numerosos bacillos acido-alcool-resistentes, e mycelio. Com pús do ganglio foram semeados tubos de batata-glycerinada, PETROFF, e gelose-glycerinada em SABOURAUD.

11-10-927—As culturas se desenvolveram bem em batata e em PETROFF e em gelose-glycerinada e no meio de conservação de SABOURAUD.

Nos esfregaços teitos com o material retirado dos tubos de PETROFF e conservação de SABOURAUD, foram vistos abundantes mycelios, ao lado de bacillos acido-alcool-resistentes, com bastonetes GRAM positivos.

Nesta data procedeu-se á repicagem desses tubos para meios proprios á tuberculose, assim como tambem para meio de SABOURAUD. Neste ultimo meio desenvolveu-se uma cultura de actinomyces.

30-11-927—As sementes depostas nos balões em 21-3-927, foram retiradas e inoculadas em 8 cobayas, obedecendo á seguinte serie:

Balão n. 1. Tuberculose renal + cogumelo actinomyces: 2 cobayas.

Balão n. 2. Tuberculose renal + cogumelo não caracterisado: 2 cobayas.

Balões III. IV. V e VI—com T. M. 1 e T. H. A.—caldo esteril limpidos: 2 cobayas para cada balão.

Durante o mez de Dezembro morreram as cobayas correspondentes aos balões III e IV, sem lesões tuberculosas. As outras se conservaram vivas sem manifestações de doença até a data actual.

Dessas experiencias decorre que *o bacillo da tuberculose foi capaz de viver em latencia no interior do caldo de cultura, á temperatura ambiente e exposto á luz, diffusa, sem se desenvolver, e snpportando a concurrencia vital com o desenvolvimento de uma cultura de cogumelo durante o prazo minimo de 45 dias e maximo de 90 dias* (*até onde chegou a nossa observação*), *sem modificação de sua virulencia.*

Por outro lado foi elle acompanhado em *symbiose pelo actinomyces que tambem foi isolado da lesão da animal.*

Restava verificar se poderia ser tambem attribuida qualquer acção pathogenica a esse actinomyces.

Com esse fim procedeu-se á inoculação de uma cobaya com fragmento da cultura em SABOURAUD-conservação (1º repique do tubo de PETROFF, onde fora semeado o pus da cobaya primitivamente infectada).

No animal infectado com o actinomyces houve desenvolvimento de tuberculose. Nos ganglios inguinaes foram encontrados numerosos bacillos de KOCH. Não foi encontrada nenhuma fórma attribuivel ao actinomyces.

Uma verificação da cultura do actinomyces (2º repique) feita posteriormente mostrou a existencia de raros bastonetes acido-alcool-resistentes. Tratava-se por consequencia de resto da semente do tubo de PETROFF, passado para o meio de SABOURAUD. Uma cultura de actinomyces semeada em SABOURAUD (3º repique) não infectou a cobaya quando experimentada.

Assim, pois, *o actinomyces não apresentou poder pathogenico para a cobaya.*

A repicagem do balão "I" feita em 7-XII-927 para SABOURAUD deu desenvolvimento á uma cultura identica á que fôra obtida após a passagem desse cogumelo pelo organismo da cobaya.

Verificou-se assim experimentalmente a concurrencia vital de um germen não pathogenico com um germem pathogenico em symbiose nas condições normaes do meio exterior, symbiose que se manteve por passagem no organismo animal, conservando-se ambos os germens com os seus caracteristicos physiopathologicos, isto é, um o seu poder pathogeno intacto (bacillo da tuberculose), o outro a sua não pathogenidade (actinomyces saprophyta).

As sementes mantidas nos balões de caldo até Novembro foram nessa data inoculadas em cobayas que se mostraram sem alteração de saúde, nenhuma dellas se Infectando.

Os tubos semeados com o pús da cobaya infectada por essa amostra de tuberculose deram desenvolvimento a magnificas culturas luxuriantes, todas, porém, dotadas de forte poder chromogeno. Quer os tubos de PETROFF, quer os de batata-glycerinada ou os de gelose-glycerinada, mostraram culturas coradas em róseo salmão mais ou menos aceentuado, atè a côr de vermelho tijolo, entremeado com coloração crême.

É digno de nota e se deve accentuar que *a propriedade chromogena mostrou-se neste caso independente da constituição chimica, do meio. Do mesmo modo, não esteve ella ligada á edade da cultura do laboratorio, por isso que foi verificada nessa amostra immediatamente depois da passagem pelo organismo da cobaya,* quando anteriormente essa amostra não tinha poder chromogeno accentuado e que tambem não se manifestou nas culturas subsequentes áquellas obtidas após isolamento do germen do pús tuberculoso.

Os preparados microscopicos dessas culturas são tambem muito interessantes.

Nelles se observou a predominancia de fórmas em streptothrix.

DISCUSSÃO

As experiencias acima relatadas nos suggerem considerações de valor pratico.

A possibilidade do bacillo da tuberculose se manter em estado de vida latente durante o prazo de 2 annos e 7 mezes, recobrando sua vitalidade pela addicção de elementos nutritivos que asseguravam ainda a conservação da vida da cultura original ao cabo de 3 annos e 5 mezes, falla muito alto em favor da grande resistencia do virus tuberculoso ás causas dysgeneticas do meio exterior.

Esta condição de resistencia e de vida latente ainda se tornou mais patente na serie experimental III.

Desta serie se conclue que a contaminação accidental por um actinomyces não se oppoz á vida symbiotica desse cogumelo com o bacillo de KOCH, conservando cada especie suas caracteristicas biologicas, a saber: não pathogeneidade do actinomyces e a pathogeneidade e virulencia do bacillo da tuberculose. *Essas experiencias nos mostraram, pois, que devemos manter grandes reservas sobre a destruição do virus tuberculoso, pelas condições dysgeneticas do meio exterior, e nos fazem pensar na possibilidade de infecções originarias de meios infectados".*

Ao mesmo pensar conduz a experimentação de SOPARKAR (16) que meverificou a virulencia de bacillos em escarros dessecados mantidos obscuridade mesmo após 309 dias.

Do exposto se deduz pois que o virus da tuberculose póde se manter em latencia de vida por prazo superior a 2 annos e 7 mezes, e viver em symbiose com um cogumelo não pathogeno por prazo de 90 dias, sujeitos as condições normaes do meio ambiente (acção da temperatura e da luz). Neste ultimo caso o virus não perdeu a sua virulencia nem a sua pathogeneidade.

Não ha entretanto na litteratura sobre o assumpto documentação concludente que permitta affirmar a condição de vida normal saprophytica ao bacillo da tuberculose.

II

Pode o bacillo da tuberculose viver em condição saprophytica no organismo animal?

É o caso do saprophytismo parasitario tantas vezes encontrado em clinica e que as seguintes observações esclarecem.

1—Doente de idade avançada. com bronchite chronica, sem bacillos de KOCH na expectoração ao exame microscopico.

A inoculação do escarro determinou na cobaya a formação do cancro da inoculação e a adenite classica com bacillos acido-resistentes.

O pús do ganglio reinoculado não determinou doença em segunda passagem, sendo reabsorvido.

2—Adolescente com tuberculose renal desde idade de 7 annos, comprovada por bacterioscopica e inoculação de urina.

O animal inoculado morreu por tuberculose generalisada no prazo de 2 mezes.

O adolescente que mantem permanente eliminação de bacillos tuberculosoe pela urina desenvolve-se normalmente e se encontra com 20 annos de idade.

A primeira destas observações mostra a possibilidade de existencia do germem em estado quasi saprophyta, incapaz já de determinar lesões lethaes no animal de experiencia emquanto que entretem o estado morbido em seu hospedador.

A segunda observação nos mostra a existencia de um germem tuberculigeno de virulencia grandemente attenuada para o seu portador, mantendo-se entretanto seu poder virulento e agressivo intacto para o animal de experiencia.

A seguinte observação de MOENKEBERG e ONETO (17) é ainda a muito suggestiva.

Féto de mãe tuberculosa, extrahido por cesareana, sem lesões tuberculosas placentarias, revela por inoculação do sangue do cordão a presença do virus que determinou a infecção classica da cobava.—O féto se desenvolveu normalmente e até a idade de anno e meio nada aparentou que revelasse doença.

As observações clinicas acima transcriptas mostram claramente uma condição especial de vida ao bacillo da tuberculose compativel com mani-

festações de virulencia as mais diversas, que se objectivam na maior ou menor receptividade de organismo infectado.

Amostras quasi que apathogenas para os seus hospedadores conservam integralmente sua virulencia para animaes de laboratorio; amostras quasi avirulentas para os animaes de laboratorio, entreteem condições morbidas no organismo hospedador.

Em qualquer dos casos, entretanto é certo que *condições de saprophytismo ainda que incompletas mostram a possibilidade que tal funcção biologica se estabeleça por condições normaes.*

Um outro ponto a abordar no estudo do saprophytismo parasitario é o da existencia possivel do bacillo da tuberculose, na intimidade dos tecidos, sem determinar lesões anatomicas, conservando ou não a sua pathogenidade para os animaes de laboratorio. As verificações experimentaes de todos os que se vem occupando com o estudo dos elementos filtraveis do virus tuberculoso, dão forte testemunho do phenomeno referido.

Do exposto se deduz pois *que o bacillo da tuberculose em condições especiaes de parasitismo pode soffrer modificações em sua virulencia de sorte a mostrar um estado particular de saprophytismo relativo.*

III

Deriva o bacillo de KOCH de uma fonte saprophytica ?

A resposta experimental a este conceito só pode ser dada pela verificação do augmento de virulencia progressivamente obtido por adaptação parasitaria dos saprophytas banaes, ou pela constatação da reversibilidade dos typos de tuberculose conhecidos, que attinja á criação de especies apathogenas.

A documentação experimental apresentada em resposta a 1a questão do presente trabalho attende ainda a questão que estudamos.

Não tem sido possivel crear, partindo de saprophytas banaes, um typo de acido-resistentes com os caracteres integraes, morphologicos, culturaes e pathogenicos attribuiveis aos bacillos da tuberculose.

Mostra entretanto a litteratura sobre o assumpto, experimentação, ainda que contraditada, tendente a evidenciar a reversibilidade dos typos de tuberculose.

DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI, e BOCCHIA, DIEUDONNÉ, SAN FELICE, KLEBS, SCHROEDER (18) fallam sobre a possibilidade de adaptação de bacillos tuberculosos de mammiferos a organismos de animaes de sangue frio, ou vice-versa. permittindo uma verdadeira transformação de um typo em outro typo.

RAMON et RAVAUT, LUBARSCK e MAYER, AUCHÉ e HOBBS, LEDOUX-LEBARD, MOELLER, A. WEBER e TANTE, VON BETEGH (19) CALMETTE não conseguem obter a adaptação do virus tuberculoso humano ou bovino aos animaes de sangue frio.

Si acaso nada de concludente resulta da experimentação que acaba de referir, é entretanto possivel demonstrar experimentalmente modificações impressas a amostras de tuberculose typicas, que, transitorias, permittem a regressão ao typo original, ou, permanentes, dão origem á constituição de uma nova raça.

TATSO BURO, YABE, MASONA SHIBATO, JOSHITO KABAYASHI (20) em 17 amostras do bacillo de KOCH observam duas variedades anomalas isoladas directamente de dois casos de tuberculose pulmonar, pelo methodo de PETROFF.

Estas duas variedades T. Y. 1 e T. Y. 2, apresentavam os seguintes caracteres: não eram acido-resistentes, coravam-se facilmente pelas côres basicas de anilina e eram GRAM positivas, morphologicamente semelhantes a um stretothrix, desenvolviam-se egualmente bem em meios communs e glycerinados a temperatura de 37°C. em 24 á 48 horas.

Mostravam fraco poder pathogeno para a cobaya cujas lesões não apresentavam nenhuma semelhança com lesões de tuberculose verdadeira.

As provas de fixação de complemento, com o sôro de cobayas inoculadas com essas amostras, quando utilisado o antigeno de BESREDKA na maioria dos casos foram negativas, emquanto que foram sempre positivas com o sôro de cobaya inoculada com tuberculose, quando utilisado como antigeno emulsões de T. Y. 1, e T. Y. 2.

Passando essas amostras novamente por meio PETROFF ou de BESREDKA com ovo, ao cabo de 3 a 8 gerações readquiriam a acido-resistencia e a morphologia do verdadeiro bacillo da tuberculose, assim como o seu poder pathogenico para as cobayas que morriam com tuberculose generalisada.

CALMETTE (21) com a B. C. G. realisou a segunda affirmação. Foi a CALMETTE possivel com GUERIN obter por artificio de culturas (meios biliados) uma raça de bacillo que não produz tuberculose no organismo dos animaes sensiveis, mas que conserva sua aptidão a secretar tuberculina, e a servir de antigeno; ella permanece toxica e não se desenvolve senão ás proximidades de 38°C.

Em intima correlação com o estudo do saprophytismo se acha o problema da mutação bacteriana.

Cabe a FERRAN (21 ter sido o genio pioneiro que abriu o caminho ao estudo das anomalias observadas no desenvolvimento do cyclo da vida do bacillo de KOCH.

Em memoravel communicação á Acad. de Sciencias e á Sociedade de Biologia de Paris em 1897 lançou FERRAN as bases de sua doutrina que desde então empolga os biologistas no afan das confirmações e das contradictas.

A demonstração dada por este sabio do pleomorphismo e da profunda modificação biologica determinadas á biologia do bacillo de KOCH por influencias exteriores; perda de acido-resistencia, acquisição de mobilidade, desenvolvimento em anaerobia, perda de virulencia, como se encontra nas raças artificiaes creadas nas culturas homogeneas, são acquisições definitivas, confirmadas pela experiencia universal.

Acreditando assim em verdadeira mutação FERRAN confere o caracter saprophyto ao elemento pathogenico. Foi esta a base orientadora do theoria que FERRAN defende com a pertinacia sómente possivel na defeza dos principios que se creem exactos.

Se possivel foi obter por modificações tão profundas da biologia do bacillo de KOCH uma raça avirulenta, condições favoraveis podem reintegral-o em sua funcção pathogenica, por nova adaptação parasitaria, e reco-

nhecendo no meio exterior a origem da vida em qualquer das suas manifestações, synthetisa FERRAN a sua doutrina denominando *alpha* (α) a todas as bacterias não acido-resistentes, de procedencia diversas, capazes de, quando em culturas puras, determinar nos animaes injectados a formação de tuberculos e a presença de bacillos de KOCH.

A esse bacillo, termo final da evolução do saprophita ao parasita pathogeno, denominou FERRAN *gamma* (γ).

Entre a bacteria *alpha* e a bacteria *gamma* ha um grupo de bacterias que mostra raças distinctas, mais ou menos proximas por seus caracteres biologicos, das bacterias *alpha* ou das bacterias *gamma*. A este grupo FERRAN denominou bacterias *béta* (β).

As bacterias *gamma* quando em caldos artificiaes de cultura perde algumas de suas propriedades, originando uma sub-raça não acido-resistente, que elle denominou *epsilon* (ε). Entre as bacterias *gamma* e *epsilon* figura a variedade acido-resistente emmulsionavel designada pelo nome de bacterias *delta* (δ).

A doutrina de FERRAN, ainda que não universalmente comprovada encontra fortes argumentos em factos de observação experimeotal. O pleomorphismo do bacillo do KOCH não soffre mais contestação. A verificação de fórmas culturaes anomalas vem dia a dia sendo comprovadas por varios pesquizadores.

ARLOING et COURMONT (23) DOSTAL (24) VAUDREMER (25) REENSTIERNA (26), PLA y ARMENGOL (27), KIRCHNER (28), ainda que sob pontos de vista diversos, conifrmam o pleomorphismo em culturas.

MELLON e ELISABETH JOST (29) verificaram lesões de natureza tuberculosa capazes de determinar a tuberculose verdadeira quando reinjectadas, e devidas um micro-organismo GRAM-negativo, semelhante aos paratyphicos.

PETROFF, BRANCH and STEENKEN, Jr. (30) obteram a dissociação da B. C. G. em colonias avirulentas "R" e colonias virulentas "S".

SWEANY (31) obteve fórmas de degeneração em condição não acido-resistente, granulares, cocoides, bacillares que revertem á fórma typica após passagem por animal. Algumas destas fórmas não podem ser regeneradas em fórmas acido-resistentes.

Em minhas experiencias partindo de amostras do typo humano, antigas em laboratorio, sem passagem por animal, obtive em sub-culturas em caldo-glycerinado e em caldo simples um bacillo GRAM-negativo se desenvolvendo em profundidade.

A primeira cultura feita mostrava filamentos granulosos acido-resistentes em cujas pontas terminaes de ramificação se apresentavam pequenas particulas não acido-resistentes appensas, sob a fórma de bastonetes. Em campos diversos dos preparados se viam essas mesmas fórmas reunidas em abundancia em estado puro.

Foram obtidas culturas dessas fórmas em estado puro em duas gerações successivas, entre o 5º e 10 dias após a sementeira. Não se desenvolveram em gelose inclinada e se extinguiram após a 2a passagem em caldo, onde não eram mais vistas estas fórmas após a 3a passagem, permanecendo entretanto o caldo levemente turvo.

Por menos concludentes que sejam as observações acima declaradas deixam ellas entrever a possibilidade de uma mutação bacteriana no typo dos elementos previstos por FERRAN, e só a continuidade e repetição das experiencias permittirá um juizo definitivo.

Assim concluiremos:

É possivel a mutação do bacillo de KOCH em typos pleomorphicos e avirulentos, mas, apezar da grande serie de factos experimentaes accumulados, tendentes a julgar da possibilidade da transformação por caracteres adquiridos hereditariamente, ou por mutação das bacterias saprophytas acido-resistentes ou não, em verdadeiros bacillos de KOCH, não se poude ainda obter a demonstração peremptoria desse phenomeno.

BIBLIOGRAPHIA

1—W. KOLLE, H. SCHLOSSBERGER und W. PFANNESTIEL—Tuberkulose—Studien IV—Ueber die Tierpathogenität u. s. w. Deutsch. Med. Woch.—21 April—937.

2—JOSEF YGERSHEIMER and HANS SCHLOSSBERG—Tuberkulose Studien V—Zur Pathogenität der Säurefeste Bakterien. in besonderen der Passage stamme säurefester Bazillen. Deutsch. Med. Woch.—12 Mai 1921, pg. 526.

3—SAN FELICE—Anali de Ygieni XXXI—1921—pg. 457.

4—BRUNO LANGE—Weitere Untersuchungen über einige der Tuberkelbazillen verwandete. Saurefeste Saprophyten. Deutsch. Med. Woch 182—Juli 1920—pg. 763. Zeilscho. F. Hyg.—T. XCIII—1921. pg. 43—73. Deutsch. Med. Woch.—17 March 1922. pg. 350.

5—BRUNO HEYMANN und WALTER STRAUSS—Deutsch. Med. Woch. 28 Juillet 1922. pg. 999 und 1000.

6—DAL COLLO, G. P.—Contributo alla conosceza dei rapporti fra bacillo tubercolare ed altri germi ácido-resistenti. Boll. Inst. Sierot. Milaneze.—T. III—1924. pg. 95.

7—MAHER STEPEN—The origin of the tubercle bacillus. The Amer. Rev. of Tub.—Vol. XII—n. 4. Dec. 1925.

8—A. CALMETTE—Sur la question du transformisme des bacilles paratuberculeux et des bacilles tuberculeux. Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXII—pg. 593.

9—PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON—Congrés International de la Tuberculose.—Paris—1905.

10—IRIMESCU—Id. Id.

11—OGAWA, TOYO—Untersuchungen über Komplementbildung bei Tuberkulose. II Mil. Zeitschrift für Im. Forsch. Band.—44 Sept. 1925—2/3—S. 218—244.

12—DESCOS, RODET et GALAVIELLE—Congrés Int. de la Tuberculose. Paris—1905.

13—J. AUCLAIR—Les modifications du bacille tuberculeux humain. Aptitude du bacille de KOCH á se transformer en saprophyte. Arch. de Med. Exp. n. 4—Juillet 1903.

14—LEON KARVACKI—Saprophytisme des Bacilles Tuberculeux.
Cont. Rend. Soc. Biol.—T. C. n. 13—1929—pg. 1152.

15—A. FONTES e BARBOSA DA CUNHA—Inst. Oswaldo Cruz.
Supplemento das Memorias n. 3. Nov. 1928.

16—M. B. SOPARKAR—The Vitality of the Tubercle Bac. outside the Body.
Indian Jor.—of Med. Ses.—T. IV—f. 4.—April 1917—pg. 627, 650.

17—MOENKEBERG e ONETO—2o. Congresso Pan Americano de Tuberculose—Cordoba—Out. 1927.

18—DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI e BOCCHIA, DIEUDONNE, SAN FELICE, KLEBS, SCHROEDER—Rev. Med. de Hamburgo n. 7—Julio 1925. Numero em homenage del LX aniv. del Prof. Dr. L. BRAUER.

19—RAMON et RAVAUT, LUBARSCH, et MAYER, AUCHE et HOBBS, LEDOUX, LEBARD, MOELLER, A. WEBER et TANTE, VON BETEGH—Apud.—CALMETTE—op. cit. n. 8.

20—TATSO BURO, YABE MASONA, SHIBATO KABAYASHI—Studies. on the greatly changed form of tubercle bacillus etc. etc. (red. at. the second Congress of the Japan 1927. Tuberculosis Ass.—Med. in Osaka—April 6.

21—A. CALMETTE. Op. Cit. (8).

22—FERRAN J.—Las mutaciones bacillares en lo que afectan a la etiologia la patogenia, la profilaxis y la terapeutica de las infec. pre-tuberculosas e tuberculosas.

23—ARLOINH—Sur l'obtention de cultures homogènes du bacille de la tuberculose.
C. R. Ac. de Soc.—9 Mai 1898.

—ARLOING, et GOURMONT—C. R. Ac. de Sc.—8 Out. 1898—pg. 312.

24—DOSTAL—Wien. Med. Woch. 1913 n. 12 e 15.

25—VAUDREMER—Le Bacille Tuberculeux.
1 Vol.—Presses Universitaires.—1927.

26—REENSTIERNA, J.—Sur la vie non acido-résistente du microorganisme de la tuberculose.
Arch. del l'Inst. Pasteur de Tunis—T. XV—n. 4—1926. pg. 309.

27—PLA y ARMENGOL—Concepto clinico de la tuberculosis et. etc. Publicações do Inst. Ravetllat-Pla—Barcelona—1927.

28—KIRCHNER, O.—Studien Zur Morphologie und Biologie des Tuberkuloseerregers. III—Nicht saurefeste Formen in Saponin-Glycerin-Bouillon-Kulturen.
Beitrage zur Klinik der Tuberkulose. 70 Band—Heft 3 pg. 375.

29—MELLON, RALPH, R. and ELISABETH L. JOST. Experiments on the Filterability of the granular Phase of the Tubercle Bacillus.—The Amer. Rev. of Tuberc. Vol. XIX—Mai 1929—n. 5—pg. 483.

30 – PETROFF S. A., BRANCH, ARNOLD, STEENKER Jr. WILLIAN— A Study of Bacillus CALMETTE GUERIN, etc. The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. XIX—Jan. 1929 – n. 1— pg.

31 – SWEANY, HENRY C. – The Regeneration of Acid-Fastness in Apparently Degenerated Tubercle Bacilli. The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. YVIII—Nov. 1928 – 630.

SAPROPHITISM OF THE TUBERCULOUS BACILLUS (1)

By Dr. A. FONTES

Chief of Service of the Oswaldo Cruz Institute

(Official Reporter of the Thema)

The notion of *saprophytism* has to be considered under various aspects when studying the bacillus of tuberculosis: under the aspect as classifically admitted, biologic notion; under the aspect of avirulence for the host, pathogenic notion; aspect of reversibility of characters, that may allow classifying the agent of the tuberculous infection as proceeding from a unic source, the starting point of apathogenous, symbiotic, or virulent types, phylogenetic notion.

I

Does the tuberculous bacillus in saprophytic life exist in the external medium?

A natural tendency of mind is the belief that, kinds, actually pathogenic, may have adapted themselves to parasitary life; some ones not completely, still able to perform the usual function and only occasionally living parasitically; some others which have adapted themselves to parasitary life to such an extent that they have lost their property of living under the conditions of the external medium, if not completely, at least, almost entirely. These species may live in conditions of saprophytic life, only under special circumstances, this is in the microbiological sense, or subject to constant changes of the external medium.

The study of the saprophytic microbian flora revealed the existence of a class of microörganisms, morphologically similar to the KOCH's bacillus, and like same characterized by the peculiar structure which bestow upon them the property of being acid-fast.

This class, also known as para-tuberculous germs, shows specimens in the soil, vegetables, in various animal products; and, should, by chance, the tuberculigenous property of any one of these species be demonstrated, this would mean a great light thrown not only upon the microbiologic but also upon the medical and hygienic problems, in relation to tuberculous infection.

Verifications directed in this way, still contradictory, did not find, up to this day, a practical confirmation.

The experiments of KOLLE, SCHLOSSBERG and PFANNESTIEL (1) who, by inoculating acid-fast saprophytic bacilli and tuberculous bacilli of of cold-blooded animals, succeeded by intra-peritoneal injection to Guinea pigs, through successive passages, in determining generalized tuberculous

(1) Memorial read before the 2nd Pan American Congress of Tuberculosis, held in Rio de Janeiro, from the 30th of June to 7th of July 1929.

infection; those of JOSEF IGERSHEIMER and H. SCHLOSSBERGER (2), who, injecting para-tuberculous bacilli within the anterior chamber of the eye of Guinea pigs, provoked severe lesions similar to those caused by tuberculous bacilli; those of SAN FELICE (3), who got to typical tuberculous infections starting from an acid-fast streptothrix, isolated from a rat, are in opposition with BRUNO LANGE's, (4) effected with acid-fast material from the respiration apparatus, BRUNO HEYMANN and WALTER STRAUSS' (5) and DAL COLLO's experiments (6).

MAHER (7) reports meanwhile he has isolated, from a traumatic abscess in scrotum, an acid-fast bacillus with the characters of the smegmatic bacillus, which, after passage in potato glycerine broth in dry oven, gave birth, three weeks later, to small colonies with the appearance of colonies of the bacillus of human tuberculosis.

These colonies, used to infect a Guinea pig intraperitoneally, caused to appear the frame of generalized tuberculosis, further transmissible.

This clinical case ended 6 months later by the death, caused by pulmonar active tuberculosis, though clinically undetected by occasion of the infection of the scrotum.

CALMETTE (8), with BOQUET and NEGRE, did not succeed, even after 10 passages through Guinea pigs and rabbits, in getting an increase of virulence of a *phléole* strain, of MOELLER, nor in determining the power of provoking the formation of tubercles; they verified, however, that, after passage through the animal organism, this strain was more easily cultivable at a temperature of 37°C, and it determined the phenomenon of KOCH in tuberculous Guinea pigs, in spite of having no protective power in relation to subsequent inoculations of the tuberculous bacillus.

A further result from the observation of a great many investigators, is that the condition of pathogenicity may be, however accidentally, showed by the common acid-fast bacilli, or by para-tuberculosis. This conclusion is that of PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON (9); and even biological reactions have been brought, which mean a similarity between the para-tuberculous and the true tuberculous bacilli.

The para-tuberculin ef IRIMESCO (10), the antigenic function proved by OGAWA (11), the study of the biology of various strains (COURMONT, CANTACUZENE, DESCOS, RODET and GALAVIELLE (12) would tend to prove in favor of the possible relationship between common acid-fast bacilli and the KOCH's bacillus.

If practically it was till now impossible to demonstrate clearly the tuberculigenous pathogenous function of saprophytic acid-fast bacilli, in order to allow of a positive phylogenetic relationship between these and the bacilli of tuberculosis to be established, one may however affirm that: *special circumstances may act upon these latter transforming them into types which, little by little, become more similar to the common acid-fast type, in consequence of deep alterations of their biology, turning them avirulent, modifying their biochemism so as to make them lose the main characteristics of the pathogenous bacilli, in narrow relation with the life condition of forced parasitism.*

The former verifications of AUCLAIR (13 are also favorable to such a thesis.

Most interesting observations have been lately communicated to the Polish Society of Biology by LEON KARVACKI (14). KARVACKI has in his power ten strains of tuberculous bacilli which germinate and develop in cultures at the laboratory's temperature. Four realize the full saprophytic frame: easy development in common media, at laboratory's temperature, avirulence for laboratory animals, chromogenic function well marked. These strains, of human and equine origin, show also deep alterations of their cultural metabolism; modification and lowering of their fermentative power in some, a marked smell of trimethylamin, and the production of a weak tuberculin. The remaining 6 samples show till now a defficient saprophytism.

Notwithstanding their developing at the air temperature, this development is a slow one, and can only take place in media fit to tuberculosis. Already a part of them is apathogenous for Guinea pig.

The observations I am carrying on since the year 1923 in this direction, appear to be an eloquent statement in favor of the possible saprophytism of the bacillus of tuberculosis. Is is my duty to write again what I published with BARBOSA DA CUNHA (15), for a better understanding of the conclusions.

* * *

"Cultures of avian and bovine tuberculosis, already kept a long time ago in the laboratory, with 5 months culture in glycerine gelose at 5 o/o, were transplanted on the 5. VII. 23 to SABOURAUD's maltosed medium. and SABOURAUD's maltosed and glycerined medium at 5 o/o. The cultures developed luxuriantly in the tubes containing the glycerine medium, but were less abundant in the tubes without glycerine. The strains smeared acted likewise, without having been possible to establish an appreciable difference in the development of the respective colonies, when compared in the same media (Observation made on 11. XI. 1923).

By that date, we effected again a passage through the same media, and observed then, one month later, more abundant cultures. These were kept up to the month of April 1924, when we then undertook the verification with new series, making use of the oldest strains of the collection at the Institute. Among these, we must point out that of T. M. 1 (human type) which, by that opportunity, had suffered some 25 successive passages through artificial media, without any passage to animal whatever, and which had kept all its virulence and classical morphologic and cultural characters.

Not only this strain, as also another of the human type (T. M. 4) and others of the bovine type were maintained by successive passages in SABOURAUD's maltosed, glycerine-glycose-maltosed, glycerine-glycosed, preserving, preserving-glycerined, and gelose-glycerined media, until the month of October 1924, without noteworthy or marked differences having been recorded about the development of cultures, or the virulence of the strain.

Repeated examinations of these cultures showed that they always kept their morphologic rod-like form, more or less granulous, their more or less marked acid-fast condition and their virulence without any note-

worthy alteration. The same occurred in cultures maintained by renewed passages in liquid media of the same composition as the SABOURAUD (excepting the gelose) and into the medium used for preparing the vaccine of carbunculus symptomaticus, strongly favorable to weakening this germ, and consisting of flesh broth, serum of horse and glycose.

Still in this case, the strains of tuberculosis smeared developed without losing any noticeable part of their virulence and without any sensible alteration of their morphology and cultural characters.

Some ones of the tubes of culture in SABOURAUD's maltosed, glycerine maltosed and glycose-maltosed were left out of the dry oven, exposed to diffuse light, plugged with a simple cork, without replanting. They were kept thus from August 1924 to November 1926, and were afterwards smeared again in new tubes of SABOURAUD's medium. *The smearings did not develop in the replanted tubes, in spite of these having been kept in the dry oven for 45 days.*

Then, we added a small quantity of plain broth to the original tubes, and these were maintained in the dry oven up to the month of February 1927. By that date, the strain T. M. 1 smeared on SABOURAUD-glycosed medium on the 29. VIII. 24, having been replanted again, gave birth to luxuriantly developing cultures of acid-alcohol-fast tuberculous bacilli.

On the 6th January 1929, we undertook a new transplanting of the smears from the original tube T. M. 1, which had been smeared in August 1924, and noted a fair development in all the smeared tubes.

The vitality of the culture on SABOURAUD's glycosed medium lasted still, after three years and five months. The other strains did not more develop.

The experiments above referred to, demonstrate *the possibility for the bacillus of tuberculosis to keep in condition of latent life in artificial cultures for a delay of 2 years and 7 months, recovering its virulence (in the meaning of capacity of reproduction) without losing its morphologic and natural characters, it being sufficient to find elements* favorable to its development: HEATH, NUTRITIVE ELEMENT and HUMIDITY.

* * *

These experiments induced us to verify the possibility of the bacillus living under conditions near to the natural saprophytism. For this purpose, we undertook the following series of experiments, report of which we give hereunder:

12st March 1927.—2 balloons containing broth with 5 o/o glycerine were smeared superficially with culture in skin of T. M. R. (a strain isolated from human urine, human type); 2 baloons with a culture in skin shape of T. H. A. (human type, isolated from sputum).

These balloons were kept at laboratory's temperature, exposed to the action of diffuse light.

During the first week, all smeared skins had sunk to the bottom of the balloons.

5. 5. 1927.—In one of the balloons smeared with T. M. R. (balloon N. 1) the smearing sunk, served as a base for the development of a fungial culture (observation made 48 days after smearing).

22. 6. 1927. – By that date, a fragment of the smearing in balloon N. 1, which bore a particle of the fungial culture, was emulsioned with a small quantity of a saline solution, and inoculated to 2 Guinea pigs.

These Guinea pigs showed a chancre and the corresponding ganglia with infarct within the usual delay.

22. 8. 1927.—By that date, an inguinal ganglion was extirpated from one of the Guinea pigs. Rubbings of this ganglion contained numerous acid-alcool-fast bacilli with mycelia. With the pus of the ganglia, we smeared tubes containing potato glycerine, PETROFF's medium, and Glycerined gelose in SABOURAUD's medium.

11. 10. 1927.—The cultures developed fairly in potato and in PETROFF's, in glycerined gelose and in SABOURAUD's preserving medium.

In the rubbings obtained with the material taken off the tubes of PETROFF and SABOURAUD conservation, abundant mycelia were observed, together with acid-alcohol-fast bacilli with GRAM-positive rods.

By that time, we undertook a new smearing of the contents of these tubes into media fit for tuberculosis, as also into SABOURAUD's medium. The last stated medium showed development of a culture of actinomyces.

30. 11. 1927.—The germs smeared in the balloons on 21. 3. 1927, were taken off them, and inoculated to 8 Guinea pigs, according to the following series:

Balloon 1. – Renal tuberculosis plus fungos actinomyces: in 2 Guinea pigs.

Balloon 2.—Renal tuberculosis plus uncharacterized fungos: in 2 Guinea pigs.

Balloon III. IV. V and VI with T. M. 1 and T. H. A. – sterile limpid broth: 2 Guinea pigs for each balloon.

During the month of December, the Guinea pigs corresponding to balloons III and IV died, without tuberculous lesions. The other ones kept alive, without any sign of disease up to this day.

From these experiments results that *the bacillus of tuberculosis was able to live latently within the culture broth, by laboratory's temperature and exposed to diffuse light, without developing, and bearing vital competition with a developing culture of a fungus, for a delay of at least 45 days, the maximum being 90 days (this is the point where our observation ended) without any change in its virulence.*

On the other side, it was accompanied *symbiotically by the actinomyces that was equally isolated from the lesion in the animal.*

Still remained to ascertain whether any pathogenic action could be ascribed to this actinomyces.

For this purpose, we realized the inoculation, in one Guinea pig, of a fragment of the culture in SABOURAUD-preserving medium (1st replant of the PETROFF tube, in which the pus of the originally infected Guinea pig had been smeared).

In the animal infected with the actinomyces, there was a development of tuberculosis. In the inguinal ganglia, numerous KOCH's bacilli were found. No form that may lead to think of actinomyces was visible.

A verification of the culture of the actinomyces (2nd replanting) effected afterwards, proved the existence of rare acid-alcohol-fast rods. Consequently, it could be nothing else but the remainder of the smearings in the PETROFF's tube, passed over to the SABOURAUD's medium. A culture of actinomyces smeared in SABOURAUD (3rd replantiug) did not infect the Guinea pig when tried.

Consequently, *the actinomyces did not show any pathogenic power for Guinea pig.*

Replanting the contents of balloon "I", effected on the 7. XII. 1927 to SABOURAUD's medium, gave way to developing a culture identical to that obtained after passage of this fungus through the organism of the Guinea pig.

Thus was experimentally verified the vital competition of a non pathogenic germ in symbiosis, under normal conditions of the external medium, which symbiosis lasted by means of passage into animal organism, both kind of germs keeping all their own physiopathologic characters, that is to say, one its pathogenic power untouched (bacillus of tuberculosis) the other one its non pathogenicity (actinomyces saprophyta).

The semen kept in the balloons with broth until November, were by that date inoculated to Guinea pigs, which kept in perfect condition of health, none of them having been infected.

The tubes smeared with the pus of the Guinea pig infected with this strain of tuberculosis provoked development of splendidly luxuriating cultures, all, of which, however, possessing a strong chromogenic power. Both the PETROFF's tubes, and those with glycerine potato as also glycerine gelose, showed cultures more or less markedly colored in salmon rose, and even up to a brick-red shade mixed up with creamy colour.

Noteworthy it is, and on this we must insist, that *the chromogenic property showed, in that case, independent from the chemical composition of the medium. Likewise it was not bound anyhow with the age of the culture, the fact being that it could be verified in that strain immediately after passage in the Guinea pig's organism,* whereas that same strain did not possess any marked chromogenic power, nor such appearing in cultures subsequent to those obtained after isolation of the germ of the tuberculous pus.

The microscopic preparations of these cultures are also worth of great interest.

Forms in streptothrix were there observed, predominating.

DISCUSSION

The experiments above referred to lead us to formulate some considerations of practical value.

The possibility for the bacillus of tuberculosis to keep itself in condition of latent life for a delay of 2 years and 7 months, recovering afterwards its vitality by addition of nutrient elements which still ensure the continuation of the living state of the original culture after 3 years and 5

months, should be an argument in favor of the great resistence of the tu berculous virus to dysgenetic causes of the external medium.

This condition of resistence and latent life is made still more obviou in the experimental series III.

From this series, one may conclude that accidental contamination b an actinomyces does not prevent the symbiotic life of this fungus togethe with the KOCH's bacillus, each species keeping its own biologic character say: non pathogenicity of the actinomyces, pathogenicity and virulence o the bacillus of tuberculosis. *These experiments proved us, accordingly, w must be most reserved with regard to destruction of the tuberculous virus, b the external dysgenetic conditions; besides, they induce us to think of the pos sibility of infections starting from infected media.*

This supposition shonld also receive some support from the expe riment of SOPARKAR (16) who verified the virulence of the bacilli in drie sputum kept in the dark even after 309 days.

From the foregoing may be deducted then, that the virus of tuber culosis can keep in latent life for a delay above 2 years and 7 months, an live in symbiosis with a non-pathogenous fungus during 90 days, subjec to the normal conditions of the surrounding medium (action of tempera ture and of light). In this latter case, the virus lost neither of its viru lence nor of its pathogenicity.

There is, however, in literature about the matter, no definitive documen tation that may allow affirming the condition of normal saprophytic life o the bacillus of tuberculosis.

II

Can the bacillus of tuberculosis live in saprophytic condition in anima organism?

It is but the case of parasitary saprophytism most frequently foun in clinic, and on which the following observations will bring some light.

1—Patient of advanced age, with chronical bronchitis, withou KOCH's bacilli being observed microscopically in experimentation.

Sputum inoculated to Guinea pig, determined in this the formatio of a chancre at the inoculation spot, and the classical adenitis with acid fast bacilli.

Pus of the ganglion reinoculated did not determine any disease, on second passage, being reabsorbed.

2—Young fellow with renal tuberculosis since the age of 7, confir med by bacterioscopy and inoculation of urine.

The animal we inoculated died of generalized tuberculosis within months.

This young man, who goes on eliminating tubercnlous bacilli throug urine, grows normally and is now 20 years old.

The first of these observations shows the possibility of the germ existing under saprophytic condition, already unfit for determining morta lesions to the animal of experiment, however maintaining the morbid con dition in its host.

The second observation proves the existence of a tuberculigenou

germ, whose virulence shows extremely weakened for its bearer, keeping however its virulent and aggressive power for the animal of the experiment.

The following observation of MOENKEBERG and ONETO (17) is still more suggestive:

A fetus of tuberculous mother, delivered by cesarean section, without tuberculous placentary lesions, revealed, by inoculation of blood from the cord, the presence of the virus which determined the classical infection of Guinea pig.—The fetus developed normally and up to the age of one and a half year, did not show any sign of being infected.

The clinical observations as transcripted hereabove, show clearly a special condition of life for the bacillus of tuberculosis, compatible with the most varied manifestations of its virulence, which are made patent by a greater or smaller receptivity of the infected organism.

Strains, which would apparently be apathogenous for their bearers, keep their full virulence for laboratory animals; strains almost not likely to infect laboratory animals, may entertain morbid states in the organism of the host.

In any or other of these cases, however, one thing is certain, say: *conditions of saprophytism, notwithstanding being uncomplete, show the possibility af such biologic function establishing itself under normal conditions.*

Another point we must approach when studying the parasitary saprophytism, is the one referring to the possibility of existing the bacillus of tuberculosis, within the substance of the tissues, without determining there anatomic lesions, keeping or not its pathogenicity for laboratory animals. The results of the experiments of all those devoting themselves to the study of filtrable elements of the tuberculous virus, are a creditable witness of the phenomenon alluded to.

Of the foregoing may be deducted then, that *the bacillus of tuberculosis, under special conditions of parasitism may undergo alterations in its virulence, so as to show o particular state of relctive saprophytism.*

III

Does the KOCH's bacillus derive from a saprophytic source?

An experimental answer to this conceit can be given, only by verifying the increase of virulence to be progressively obtained by a parasitary adaptation of the eommon saprophytes, or by ascertaining the reversibility of the types of tuberculosis known up to now, which may result In the creation of apathogenous species.

The experimental documentation we expose here, in reply to the first question of the present work, attends also to the question we are now studying.

It has not been possible to create, starting from common saprophytes, a type of acid-fast bacilli with the integral, morphologic, cultural pathogenons characters which belong to the bacillus of tuberculosis.

Literature points out however on the subject, experiments which, notwithstanding having been subject to contradiction, show a tendency to make patent the reversibility of the types of tuberculosis.

DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI, and BOCCHIA, DIEUDONNE, SAN FELICE, KLESS, SCHROEDER (18) report of the possibility of the tuberculous bacilli of mammiferous adapting to organisms of cold-blooded animals, or vice versa, allowing thus a real transformation from the other type.

RAMON and RAVAUT, LUBARSCK and MAYER, AUCHE and HOBBS, LEDOUX-LEBARD, MOELLER, A. WEBER and TANTE, VON BETEGH (19) CALMETTE do not succed in adapting the human or bovine tuberculous virus to cold-blooded animals.

If anyhow nothing in conclusion is to be drawn from the experimentation I am referring to, it is at least possible to demosntrate experimentally the changes caused to strains of typical tuberculosis, which, being transient, allow them to go back to the original type, and if permanent, cause a new race to constitute itself.

TATSO, BURO, YABE, MASONA SHIBATO, JOSHITO KABAYASHI (20) in 17 strains of the KOCH's bacillus, observed two abnormal varieties isolated directly from two cases of pulmonar tuberculosis, by PETROFF's method.

These two varieties, T. Y. 1 and T. Y. 2, corresponded to the following characters: they were not acid-fast, were easily stained by basic aniline colours, and GRAM positive, morphologically similar to a streptothrix; they developed quite as well in common and glycerined media at a temperature of 37° within 24 to 48 hours.

They showed little pathogenic power for Guinea pig, and the lesions of these did not present any similarity with those of true tuberculosis.

The tests about complement fixation, with the serum of Guinea pigs inoculated with these strains, when making use of BESREDKA's antigen, were negative in most cases; on the other hand, they remained positive in every case with serum of Guinea pig infected with tuberculosis, whenever the antigens used were emulsions of T. Y. 1 and T. Y. 2.

These strains being again passed through PETROFF's or BESREDKA's medium with egg, had after 3 or 8 generations, the acid-fastness and morphology of the real bacillus of tuberculosis restored, as well as their pathogenic power for Guinea pigs, which died from generalized tuberculosis.

CALMETTE (21), with the B C. G., realized this second affirmation of ours. CALMETTE succeeded, together with GUERIN, to obtain, by an artifice of cultures (biliated media) a race of bacillus that does not provoke tuberculosis in the organism of sensible animals, but keeps its power of secreting tuberculin, and of actjng as an antigen; it remains toxical and does not develop, except when subject to a temperature about 38°C.

In very narrow correlation with the study of saprophytism stands the problem of bacterian mutation.

FERRAN has been the genial pioneer, who first opened the way to the study of abnormalities observed in the development of the life cycle of the KOCH's bacillus.

In a memorable communication read before the Academy of Sciences and the Society of Biology in Paris in the year 1897, FERRAN established

the basis on which his doctrine reposes, which doctrine attracts all the best of efforts of biologists, either in confirming or in contracting it.

The demonstration this very learned doctor made of the pleomorphism and the deep biologic alteration brought into the biology of the KOCH's bacillus, owing to external conditions; loss of acid-fastness, creation of mobility, development in anaerobic condition, loss of virulence, as observed in artificial races created in homogenous cultures, are definitive gains, confirmed by universal experience.

In his belief of such a real mutation, FERRAN ascribes thus a saprophytic character to the pathogenic element. This was the starting point on which FERRAN based the theory he defends with the pertinacy proper to those only who have full faith in the principles they think to be the truth.

If it has been possible to obtain by such deep alterations of the biology of the KOCH's bacillus, an avirulent race, certain favorable conditions may restore completely its pathogenic function, by a new parasitary adaptation. Then, recognizing the origin of life in any of its manifestations, to exist in the external medium, FERRAN synthetizes his doctrin in denominating *alpha* (α) all non acid-fast bacteria, from various origins, likely to determine, when in pure cultures, in the inoculated animals, formation of tubercles with the presence of KOCH's bacilli.

To this bacillus, the final term of the evolution of the saprophyte to pathogenous parasite, FERRAN gives the name *gamma* (γ).

Between the (α) bacteria and the (γ) bacteria, there is a group of bacteria which shows distinct races, more or less kindred by their biologic characters, to the α or the γ bacteria. This group FERRAN names *beta* (β).

The *gamma* bacteria, when in artificial culture brothes, lose some of their properties, giving origin to a non acid-fast sub-race which he names *epsilon* (ε). Between the *gamma* and *epsilon* bacteria, there is an acid-fast emulsionable variety, whose designation is *delta* (δ).

FERRAN's doctrine, though not universally confirmed and approved, finds strong arguments in facts of experimental observation. The pleomorphism of the KOCH's bacillus can no more be discussed. Day by day, the verification of abnormal cultural forms is confirmed by various investigators.

ARLOING and COURMONT (23) DOSTAL (24) VAUDREMER (25) REENSTIERNA (26) PLA y ARMENGOL (27) KIRCHNER (28), however, under different point of views, confirm pleomorphism in cultures.

MELLON and ELISABETH JOST (29) verified lesions of tuberculous nature able to determine genuine tuberculosis when injected anew, the same being caused by a GRAM negative microörganism, similar to the agents of paratyphus.

PETROFF, BRANCH and STEENKEN Jr. (30) succeeded in dissociating the B. C. G. into avirulent colonies "R" and virulent colonies "S".

SWEANY (31) got forms of degeneration in non acid-fast condition, these forms being granular, coccoid, bacillar, which turn back to the typical form after passage into animal. Some of these forms are not able to be restored to acid-fast forms.

In my experiments, starting from strains of the human type, old in the laboratory, without passage through animal, I obtained in sub-cultures of glycerine-broth and in plain broth, a GRAM positive bacillus that developed well in the depth.

The first culture made, showed granulous acid-fast filaments, at whose terminal point of ramification, small non acid-fast particles appeared pending, under the form of rods. In various fields of the preparations, these same forms were to be seen, abundantly united in pure condition.

Such forms in pure condition allowed us to obtain cultures in two successive generations, within the 5th and the 10th day of smearing. They did not develop on slanting gelose and desappeared after the second passage in broth. They were not more to be seen after a third passage, the broth remaining still slightly turbid.

In spite of not being absolutely conclusive the above stated observations, they allow to admit of a bacterian mutation in the type of the elements supposed by FERRAN. Only carrying on further experiences and having them repeated, may enable one to make a definite judgment on the subject.

Our own conclusion will be:

The mutation of the KOCH's bacilli into polymorphic and avirulent types is possible, but, in spite of the wide series of accumulated experimental facts, which show a tendency to admit the possibility of this transformation by characters acquired hereditarily, or by mutation of saprophytic bacilli, acid-fast or not, into real KOCH's bacilli, no peremptory demonstration of this phenomenon could be got at up to this day.

BIBLIOGRAPHY

1—W. KOLLE, H. SCHLOSSBERGER und W. PFANNESTIEL—Tuberkulose—Studien IV—Ueber die Tierpathogenität u. s. w. Deutsch. Med. Woch.—21 April—937.

2—JOSEF YGERSHEIMER and HANS SCHLOSSBERG—Tuberkulose Studien V—Zur Pathogenität der Säurefeste Bakterien. in besonderen der Passage stamme säurefester Bazillen. Deutsch. Med. Woch.—12 Mai 1921, pg. 526.

3—SAN FELICE—Anali de Ygieni XXXI—1921—pg. 457.

4—BRUNO LANGE—Weitere Untersuchungen über einige der Tuberkelbazillen verwandete. Saurefeste Saprophyten. Deutsch. Med. Woch 182—Juli 1920—pg. 763. Zeilscho. F. Hyg.—T. XCIII—1921. pg. 43—73. Deutsch. Med. Woch.—17 March 1922. pg. 350.

5—BRUNO HEYMANN und WALTER STRAUSS—Deutsch. Med. Woch. 28 Juillet 1922. pg. 999 und 1000.

6—DAL COLLO, G. P.—Contributo alla conosceza dei rapporti fra bacillo tubercolare ed altri germi ácido-resistenti. Boll. Inst. Sierot. Milaneze.—T. III—1924. pg. 95.

7—MAHER STEPEN—The origin of the tubercle bacillus. The Amer. Rev. of Tub.—Vol. XII—n. 4. Dec. 1925.

8—A. CALMETTE—Sur la question du transformisme des bacilles paratuberculeux et des bacilles tuberculeux.
Bul. de l'Inst. Pasteur. T. XXII—pg. 593.

9—PHILIBERT, COURMONT, CANTACUZENE, BEZANÇON—Congrés International de la Tuberculose.—Paris—1905.

10—IRIMESCU—Id. Id.

11—OGAWA, TOYO—Untersuchungen über Komplementbildung bei Tuberkulose. II Mil. Zeitschrift für Im. Forsch.
Band.—44 Sept. 1925—2/3—S. 218—244.

12—DESCOS, RODET et GALAVIELLE—Congrés Int. de la Tuberculose. Paris—1905.

13—J. AUCLAIR—Les modifications du bacille tuberculeux humain. Aptitude du bacille de KOCH á se transformer en saprophyte.
Arch. de Med. Exp. n. 4—Juillet 1903.

14—LEON KARVACKI—Saprophytisme des Bacilles Tuberculeux.
Cont. Rend. Soc. Biol.—T. C. n. 13—1929—pg. 1152.

15—A. FONTES e BARBOSA DA CUNHA—Inst. Oswaldo Cruz.
Supplemento das Memorias n. 3. Nov. 1928.

16—M. B. SOPARKAR—The Vitality of the Tubercle Bac. outside the Body. Indian Jor.—of Med. Ses.—T. IV—f. 4.—April 1917—pg. 627, 650.

17—MOENKEBERG e ONETO—2o. Congresso Pan Americano de Tuberculose—Cordoba—Out. 1927.

18—DUBARD, BATAILLON, TERRE, BERTARELLI e BOCCHIA, DIEUDONNE, SAN FELICE, KLEBS, SCHROEDER—Rev. Med. de Hamburgo n. 7—Julio 1925. Numero em homenage del LX aniv. del Prof. Dr. L. BRAUER.

19—RAMON et RAVAUT, LUBARSCH, et MAYER, AUCHE et HOBBS, LEDOUX, LEBARD, MOELLER, A. WEBER et TANTE, VON BETEGH—Apud.—CALMETTE—op. cit. n. 8.

20—TATSO BURO, YABE MASONA, SHIBATO KABAYASHI—Studies. on the greatly changed form of tubercle bacillus etc. etc. (red. at. the second Congress of the Japan 1927. Tuberculosis Ass.—Med. in Osaka—April 6.

21—A. CALMETTE. Op. Cit. (8).

22—FERRAN J.—Las mutaciones bacillares en lo que afectan a la etiologia la patogenia, la profilaxis y la terapeutica de las infec. pre-tuberculosas e tuberculosas.

23—ARLOINH—Sur l'obtention de cultures homogènes du bacille de la tuberculose.
C. R. Ac. de Soc.—9 Mai 1898.

—ARLOING, et GOURMONT—C. R. Ac. de Sc.—8 Out. 1898—pg. 312.

24—DOSTAL—Wien. Med. Woch. 1913 n. 12 e 15.

25—VAUDREMER—Le Bacille Tuberculeux.
1 Vol.—Presses Universitaires.—1927.

26—REENSTIERNA, J.—Sur la vie non acido-résistente du microorganisme de la tuberculose.
Arch. del l'Inst. Pasteur de Tunis—T. XV—n. 4—1926. pg. 309.

27—PLA y ARMENGOL—Concepto clinico de la tuberculosis et. etc. Publicações do Inst. Ravetllat-Pla—Barcelona—1927.

28—KIRCHNER, O.—Studien Zur Morphologie und Biologie des Tuberkuloseerregers. III—Nicht saurefeste Formen in Saponin-Glycerin-Bouillon-Kulturen.
Beitrage zur Klinik der Tuberkulose. 70 Band—Heft 3 pg. 375.

29—MELLON, RALPH, R. and ELISABETH L. JOST. Experiments on the Filterability of the granular Phase of the Tubercle Bacillus.—The Amer. Rev. of Tuberc. Vol. XIX—Mai 1929—n. 5—pg. 483.

30—PETROFF S. A., BRANCH, ARNOLD, STEENKER Jr. WILLIAN—A Study of Bacillus CALMETTE GUERIN, etc. The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. XIX—Jan. 1929—n. 1—pg.

31—SWEANY, HENRY C.—The Regeneration of Acid-Fastness in Apparently Degenerated Tubercle Bacilli.
The Amer. Rev. of Tuberc.—Vol. YVIII—Nov. 1928—630.

Molestia de HODGKIN

Pelo Dr. JOSÉ GUILHERME LACORTE

Sobre a nota que publicamos nestas "Memorias" a respeito do isolamento de diphtheroides de doentes atacados de molestia de HODGKIN, nota que foi apresentada á Sociedade Brasileira de Biologia a 29 de fevereiro deste anno, devemos fazer alguns commentarios e rectificações.

Por ignorarmos a sua publicação, não pudemos citar a these do Dr. ALCIDES MARQUES DA SILVA AYROSA: "Contribuição ao estudo da Molestia de HODGKIN" (São Paulo, 1923). Este trabalho sómente agora o recebemos, por intermedio do Dr. FLAVIO DA FONSECA, a quem o pedimos. O autor conseguiu, em um caso daquella molestia, isolar bacteria semelhante ao Corynebacterium hodgkini de BUNTING e YATES.

No mesmo mez em que apresentamos a referida nota, foi publicado novo trabalho sobre o assumpto, intitulado: "Contribuição ao estudo etiologico da molestia de HODGKIN" pelos Drs. SAMUEL B. PESSOA, CLOVIS CORREA e ALCIDES AYROSA. (São Paulo Medico, anno 1, fevereiro de 1929). Neste trabalho que só chegou á Bibliotheca do Instituto Oswaldo Cruz em maio, os autores referem-se ao isolamento que fizeram, em dois casos de molestia de HODGKIN, do diphtheroide em questão, com as caracteristicas do Corynebacterium hodgkini.

Em 1917 foi publicado nos Archivos Brasileiros de Medicina (pagina 417) um trabalho dos professores W. HABERFELD e C. LORDY sob o titulo "Contribuição ao estudo anatomico e clinico do syndromo de HODGKIN e do MYELOMA". Os autores não procuraram isolar o diphtheroide de que nos occupamos, mas sómente verificar o bastonete de FRAENKEL e MUCH, o que conseguiram em um caso.

Portanto, á bibliographia estrangeira citada cumpre acrescentar os bem elaborados trabalhos nacionaes aqui referidos.

Agosto de 1929.

HODGKIN's disease

By Dr. JOSÉ GUILHERME LACORTE

We have to bring here some comments and rectifications refering to our paper published in the March issue of these "Memorials", in regard to the isolation of diphtheroids from patients attaked with HODGKIN's disease, paper that was read to the Brazilian Society of Biology on February 29th-1929.

Not being aware of its publication, we did not quote Dr. ALCIDES MARQUES DA SILVA AYROSA's thesis: "Contribution to the Study of HODGKIN's disease" (São Paulo, 1923). This work has come to us just now, through Dr. FLAVIO DA FONSECA, whom we asked for. The author succeeded in isolating, in a case of this disease, bacteria which was similar to the Corynebacterium hodgkini of BUNTING and YATES.

On the very month we read our paper, another new work was published under the heading: "Contribution to the etiological study of the HODGKIN's disease" by Dr. SAMUEL B. PESSOA, Dr. CLOVIS CORREA and Dr. ALCIDES AYROSA. (São Paulo Medico, year 1, February, 1929). In this work, which was received at the Library of the Oswaldo Cruz Institute last May, the authors refer as having obtained the isolation of the mencioned diphtheroid, with all the characters of the Corynebacterium hodgkini in two cases of the HODGKIN's disease.

In 1917, the Archivos Brasileiros de Medicina (page 417) issued a work of Prof. W. HABERFELD and Prof. C. LORDY, bearing the title: "Contribution to anatomical and clinical study of HODGKIN's syndrome and of the MYELOMA". The authors did not try to isolate the diphtheroid we refer to, but only to verify the presence of FRAENKEL and MUCH's bacillus, what they obtained in one case.

Consequently, to the foreign literature quoted, it is convenient to add the valuable and well elaborated brazilian works we mentioned above.

August, 1929.

Pesquisas sobre a physiologia do lobo anterior da hypophyse e das glandulas sexuaes

Pelo Dr. THALES MARTINS

(Assistente do Instituto Oswaldo Cruz).

Os trabalhos recentes de ZONDEK e ASCHHEIM (1), SMITH e ENGLE (2) estabeleceram seguramente o papel do lobo anterior da hypophyse como regulador das glandulas sexuaes. E' sabido que a implantação do lobo anterior da pituitaria, ou as injecções de determinados extractos desse orgão, provocam nos animaes infantis, machos ou femeas, a puberdade precoce. O sexo, a especie ou a idade do animal doador não importam no resultado, qualitativamente, pelo menos entre os mammiferos.

As hypophyses de aves não dão resultados completos, (SMITH e ENGLE 2); LIPSCHÜTZ, KALLAS e WILKENS (3a), e assim tambem as de rans chilenas (Kalyptocephalus) durante o repouso sexual (LIPSCHÜTZ e PAEZ, (3b), ou mesmo em periodo de cio, (TH. MARTINS, 4) nas rans brasileiras Leptodactyllus. Em toda a serie de trabalhos ahi referidos, trata-se de implantações feitas em roedores infantis. Entretanto, HOUSSAY e GONZALEZ (5) observaram hypertrophia testicular nos sapos normaes ou hypophyseoprivos, após implantações de hypophyses de sapo.

Podemos considerar o papel estimulador da prehypophyse como geral nos mammiferos; nestes, resultados similares têm sido obtidos em grupos zoologicos os mais diversos, e até mesmo em primatas (ALLEN, 6).

A rapidez e a segurança com que os ovarios dos pequenos roedores reagem á prepituitaria, fez delles um test commodo para pesquisas no assumpto, e permittiu um grande numero de verificações interessantes. Assim, ZONDEK e ASCHHEIM (7) demonstraram a enorme eliminação de hormonio do lobo anterior durante a gravidez, ao lado do hormonio ovariano; é tão constante esse facto, que a pesquisa delle na urina constitue hoje o melhor e o mais precoce processo de diagnostico da gravidez, na especie humana. Facto digno de nota é que, alem do homem, só no chimpanzé elle foi verificado.

PUBERDADE E ELIMINAÇÃO DE HORMONIOS HYPOPHYSIARIOS.

Na puberdade masculina o hormonio do lobo anterior pode ser encontrado na urina, como referem recentemente DE JONG, LAQUEUR e DINGEMANSE (8), em resumo.

Tambem verificamos esse facto na puberdade feminina; fizemos a pesquiza em 6 moçoilas, quando se iniciavam os primeiros symptomas menstruaes. Em 2, foi possivel demonstrar a existencia de hormonios prehypophysarios na urina, pela provocação da puberdade precoce nas camondongas infantis (pesando 6 a 7 grs.), injectadas. Ahi, os factos positivos

são decisivos, e os negativos não têm grande importancia, porque não se sabe qual o momento preciso em que se dá a eliminação; isso se poderá fazer facilmente, pela pesquiza systematica da urina, acompanhando as pacientes desde um praso mais ou menos longo, antecedente á puberdade.

HYPOPHYSE E LEI DO "TUDO OU NADA".

PÉZARD (9) estabeleceu a lei do tudo ou nada, para o funccionamento endocrino do testiculo, nos gallinaceos. Elle demonstrou que acima de uma quantidade minima de testiculo, os animaes são normaes, no ponto de vista dos caracteres sexuaes. Abaixo desse minimo efficaz, o animal é igual a um castrado total. Não é possivel obter typos intermediarios, á custa de uma reducção da massa testicular. LIPSCHÜTZ e seus collaboboradores (10) demonstram que nas cobayas basta 1 % do peso normal de testiculo para manter o penis e glandulas annexas em nivel normal.

PEZARD estendeu aos ovarios a lei em questão; os novos conhecimentos sobre o hormonio ovariano trazem fortes restricções a isso; mas quanto ao testiculo, nenhum argumento de valor foi opposto. Todavia, as noções recentes sobre o papel do lobo anterior da hypophyse exijiam uma nova verificação da lei, principalmente quanto á possibilidade de provocar uma hyperfuncção testicular.

De facto, estabelecido um factor de regulação, comprehende-se muito bem que, com o enxerto de varios testiculos em animal normal, nada se obtenha de supra-normal, como verificou PEZARD. E ainda que a reducção de massa seja compensada por uma hyper-secreção, apezar de histologicamente, não serem encontrados no pequeno fragmento restante signaes seguros de hyper-funcção.

Actualmente, a lei do "tudo ou nada" poderia ser interpretada de trez modos:

1º—A hypophyse funcciona "tudo ou nada", isto é, ou não estimula, ou provoca no testiculo reacções maximaes.

2º—O testiculo só reage tudo ou nada, quer dizer, a partir de uma certa quantidade de hormonio hypophysario elle daria o maximo de effeito; ás concentrações maiores de hormonio hyp. elle seria indifferente.

3º—A lei do tudo ou nada reside nos orgãos receptores, isto é, crista dos gallinaceos, penis, glandulas annexas, etc., nos mammiferos.

Com as implantações da hypophyse ou injecção de material activo, podemos induzir no animal um estado de hyper-hypophysismo.

SMITH e ENGLE implantaram diariamente pituitaria anterior, por um periodo de 15 a 35 dias, em ratos adultos. Não houve augmento de peso nem alterações estructuraes na genitalia dos animaes em experiencia.

Nós fizemos 3 a 4 implantações de lobo anterior de hyp. de coelho em camondongos de 18—20 grs., durante um praso de 60 a 90 dias. Ao fim desse tempo, o tracto genital era examinado. Tomamos como guia as dimensões das vesiculas seminaes, e o peso dos testiculos. Em 4 animaes de 18—20 grs., as dimensões foram 14,5 × 5 mm. (comprimento e largura maximas); 15 × 5; 20 × 4,5; numeros que estão dentro dos limites normaes. O que nos chamamos "indice dimensional das vesiculas" (11), isto é, o producto L × H, seria, nos animaes acima, respectivamente 72,5, 75 e 90. Nos animaes normaes o indice varia de 60 a 115.

O peso dos testiculos não é superior ao normal. Injectamos então hormonio hypophysario extrahido da urina de mulheres gravidas, isento de hormonio ovariano e previamente verificado activo em animaes infantis. Ainda assim, nada de positivo pudemos obter, injectando 3 a 4 vezes por semana cerca de 5 a 10 unidades ZONDEK—ASCHHEIM, de cada vez; a experiencia foi feita em 4 cammondongos de 20-23 grs.

Histologicamente, não encontramos nada no testiculo que pudesse traduzir um super actividade. Apenas, em um caso de animal cryptorchidico, o testiculo abdominal apresentava uma hypertrophia intersticial que excedia muito a que se observa de regra nessa situação. Quer na nossa colleção de testiculos cryptorchidicos, quer nas microphotographias encontradas em trabalhos de diversos autores, nenhum apresenta tanta riqueza de elementos intersticiaes. E' um facto que merece elucidação posterior, tanto mais quanto no testiculo normalmente descido nenhuma reacção intersticial foi observada, nos animaes injectados ou implantados.

Em conclusão, com a technica descripta não foi possivel induzir nos orgãos sexuaes secundarias nenhum desenvolvimento acima do normal, que traduzisse uma hyperfuncção testicular.

Somente o emprego de um extracto testicular activo e sufficientemente puro para poder ser injectado em quantidades crescentes, resolverá a questão.

Quando se puder ter segurança de que realmente um animal com excesso de hormonios testiculares em circulação não ultrapassa a morphologia sexual normal, então será possivel determinar até que ponto vae a capacidade de reacção nos orgãos receptores.

CASTRAÇÃO E HYPOPHYSE.

E' sabido que após a castração, a hypophyse se hypertrophia, e modificações histologicas se estabelecem no lobo anterior (FICHERA 12).

As hypophyses dos animaes castrados, implantadas em ratos infantis, mostram actividade maior que as retiradas de animaes normaes (ENGLE, 13, EVANS e SIMPSON 14).

Na ausencia das gonadas, portanto, ha um enriquecimento de hormonio na glandula. Esse facto poderia ser interpretado por um accumulo de hormonios, que não seriam secretados após a castração. Mas ha evidencias de que depois da ablação das gonadas elles circulam em quantidade dosavel.

MATSUYAMA (15) publicou ha annos um trabalho de grande valor e que não exerceu entretanto, grande influencia sobre a marcha das pesquisas em torno das glandulas sexuaes.

Elle uniu em parabiose ratos normaes e castrados. Pela união de ratos normaes do mesmo sexo, não ha modificações genitaes que nos interessem. Mas a ligação de um castrado com um normal tem consequencias da maior importancia. E' assim que a atrophia do utero, ou do penis e glandulas annexas do companheiro castrado não se modificam com a união a uma femea normal; mas a genitalia desta soffre modificações consideraveis. Os ovarios crescem enormemente; tornam-se cysticos, e depois ricamente luteinisados. O utero atinge proporções enormes; ha hypertrophia e hypersecreção, que o distende.

GOTO (16) repetiu e confirmou as experiencias de MATSUYAMA. MATSUYAMA não deixa transparecer qual a interpretação desses phenomenos; GOTO admitte a existencia de um "Kastrhormon", substancia secretada só nos animaes castrados; com a injecção do sangue destes, provoca alterações genitaes em femeas normaes adultas.

Os conhecimentos actuaes permittem lançar um pouco de luz sobre esses phenomenos insolitos.

A interpretação mais simples e mais logica é a de que se trata do hormonio do lobo anterior da hypophyse, que passa do animal castrado para o animal normal, em parabiose.

KALLAS (17) uniu em parabiose ratos infantis; femeas castradas com femeas normaes. No fim de alguns dias, os ultimos entram em puberdade precoce, traduzida pela maturação do ovario, abertura da vagina e cio.

KALLAS é o primeiro autor que evidencia a possibilidade de ser identificada com o hormonio do lobo anterior a substancia circulante no castrado, o "Kastrhormon" de GOTO; e ainda vê na experiencia uma demonstração de que mesmo nos animaes infantis o hormonio do lobo anterior existe em circulação.

Estamos de accordo quanto á identidade entre a substancia em questão e o hormonio do lobo anterior. Discordamos, entretanto, que a experiencia prove que nos animaes infantis normaes os hormonios referidos já circulem.

Poder-se-ia julgar que, na ausencia dos ovarios, isto é, dos orgãos que normalmente fixam o hormonio hypophysario, esse ficasse livre na circulação e passasse do castrado para o normal. Mas no caso dos infantis, a concentração delles no sangue está evidentemente abaixo do limiar necessario á provocação da puberdade; e a pequena quantidade que passa de um para outro, torna difficil explicar a constancia dos effeitos, isto é, a puberdade num rato de 15 a 20 grs., quando normalmente ella só se dá em animaes pesando mais de 50 grs.

As injecções de sangue ou soro sanguineo por nós realisadas tambem demonstram a presença de hormonio hypophysario circulante nos castrados.

PUBERDADE PRECOCE PELA INJEÇÃO DE SANGUE DE ANIMAL CASTRADO.

Ratos infantis machos e femeas foram castrados, com um peso de 25–30 grs. 8 dias após, o sangue retirado por puncção do coração era injectado em ratos infantis daquelle peso. A injecção 2 a 3 vezes por dia, de 0,20 a 0,3 de sangue ou de soro, provocaram no animal injectado a abertura da vagina e o estro, a partir do 5º dia. No ovario, encontram-se os folliculos desenvolvidos e, mais raramente, corpora lutea atresica. A injecção de sangue nas mesmas condições, retirado de animaes infantis normaes, não provoca esses phenomenos, mesmo injectando doses maiores.

Dir-se-a que nos animaes infantis ou adultos, os ovarios fixem o hormonio circulante. Mas o sangue retirado em dado momento do coração, não passou todo pelo ovario.

A interpretação que nos parece rasoavel é a de que na castração

haja uma hyperfuncção de hypophyse; as gonadas exercem uma influencia directa ou indirecta sobre a a pituitaria, existindo portanto entre as duas glandulas uma interrelação mutua.

Dos factos acima descriptos, podemos por em evidencia que, na castração, observa-se em relação á hypophyse: 1º Hypertrophia. 2º Enriquecimento da glandula em hormonios. 3º Existencia delles em circulação, em grande quantidade.

A gravidez nos primatas é ainda um exemplo de influencia da genitalia sobre a hypophyse; si não foi ainda determinado de onde parte o estimulo para a enorme descarga de hormonios que se observa nessa situação, é obvio que primariamente na genitalia elle deve estar localisado; e a partir de certo tempo, talvez na placenta.

Para decidir a questão do funccionamento precoce da hypophyse ou da sua hyperfuncção, após a castração, temos experiencias em curso, nas quaes a hypophyse de um ou de ambos os animaes em parabiose, foi retirada.

O CYCLO ESTRAL DOS ANIMAES EM PARABIOSE.

Nas experiencias de MATSUYAMA e de GOTO, a atrophia do utero dos animaes castrados não se modificava quando elles eram unidos em parabiose, com animaes normaes. Pareceria, portanto, que o hormonio ovariano não passa de um para outro. Isso seria explicavel pela presença do utero, vagina ou outros fixadores eventuaes daquelle hormonio; desse modo o hormonio secretado nos ovarios seria todo elle consumido no organismo do animal normal.

Nós nos propuzemos a estudar o cyclo estral dos animaes em parabiose; para essa ultima questão, unimos uma femea castrada a uma normal, da qual retiramos completamente o utero.

Mas a experiencia demonstrou que essa ablação não era necessaria; o hormonio ovariano passa em qualquer caso, como se vê adiante.

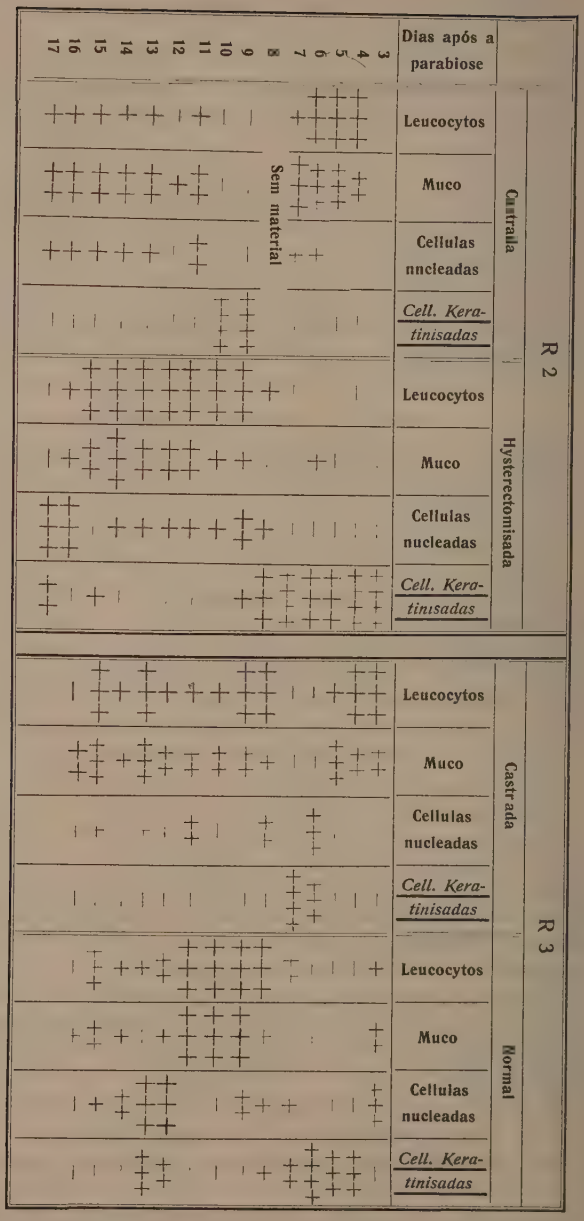
EXPERIENCIAS

6 ratos brancos da mesma ninhada foram tomados para experiencia. Quando attinjiam um peso de 35 - 37 grs., 3 foram castradas. 25 dias após, foram feitas as parabioses. Os animaes pesavam 75—80 grs; as normaes já tinham manifestado alguns cyclos estraes, e as castradas permaneciam em diestro desde a castração. Usamos a technica de SAUERBRUCH-HEYDE, (18) cœlostomia. Abertas as cavidades abdominaes, suturavam-se os animaes em tres planos: peritoneo, musculo e pelle.

A cicatrisação se fez rapidamente e os animaes se conservaram harmonicamente, isto é, sem signaes exteriores que traduzissem anemia ou plethora de um delles. Foram conservados como controle uma normal e uma castrada, livres.

O conteudo vaginal era pesquizado diariamente, com a technica usual; quando havia duvidas sobre a modificação delle, repetia-se 2 a 3 vezes por dia. No quadro figura em cada dia, o que houve de mais caracteristico.

Pode-se lembrar resumidamente que o cyclo sexual dos ratos (LONG e EVANS, 19) pode ser estudado pelo exame do conteudo vaginal.


R 2
Castrada
Hysterectomisada
Leucocytos
Muco
Cellulas nucleadas
Cell. Keratinisadas
Sem material
R 3
Castrada
Normal
Leucocytos
Muco
Cellulas nucleadas
Cell. Keratinisadas
Dias após a parabiose
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Dias	Controle normal				Controle castrada			
	Leucocytos	Muco	Cellulas nucleadas	Cell. Keratinisadas	Leucocytos	Muco	Cellulas nucleadas	Cell. Keratinisadas
3	+++	++	–	–	+++	++	–	–
4	+++	+	++	–	++	+	–	–
5	–	–	+++	+++	++	+	++	–
6	–	–	–	+++	+++	+++	+	–
7	+	+++	+	–	++	+++	+	–
8	++	++	–	–	Sem material			
9	+	++	+	–	Sem material			
10	–		–	+++	+	+++	–	–
11	–	–		+++	No material			
12	+++	++	++	–	+	+++	–	–
13	+	+	–	+	–	+	–	–
14	+	+	++	–	+	++	–	–
15	–	–	–	+++	Sem material			
16	–	–	–	+++	+	++	+	–
17	+	+	+	–	Sem material			

As variações da mucosa vaginal reflectem a phase do cyclo sexual em que se encontra o animal.

No rato ou no camondongo normal, as phases de actividade, ou estro, são traduzidas pela keratinisação da mucosa; um frottis do conteudo vaginal mostrará grande abundancia de cellulas eosinophilas sem nucleo coravel, e ausencia de leucocytos.

Durante o repouso ou diestro, o frottis mostra leucocytos, muco e cellulas nucleadas, em menor abundancia. A castrada vive invariavelmente em diestro; a introducção de hormonio ovariano, por injecção ou implantações provocará o estado do estro.

* * *

O par R2 é formado pela união de uma castrada com uma normal; dessa ultima, foi retirado completamente o utero. de accordo com o raciocinio desenvolvido atraz. R3 é constituido pela parabiose de uma castrada com uma normal. Os controles — normal e castrada — figuram ao lado.

Como se vê, da maneira a mais nitida, as femeas não castradas entram em estro prolongado, pouco depois da união com castrados. No par R2, esse estado de estro foi mantido durante 6 dias; em R3, elle durou cerca de 4 dias.

Facto novo e interessante, o animal castrado tambem manifestou signaes completos de estro, o que significa a passagem de hormonio ovariano proveniente do animal não castrado. Mesmo no animal R3 normal, em que não se fez nenhuma alteração operatoria dos orgãos genitaes, a passagem de hormonio ovariano para o castrado se fez amplamente. Portanto, o utero e demais receptores não foram obstaculo ao intercambio hormonal.

Um facto que merece assignalado, é a intensidade de keratinisação da mucosa vaginal. Tanto nas parabiosadas castradas como nas não castradas, a massa de cellulas keratinisadas enchia amplamente a vagina, em quantidade que nunca foi por nós observada nos animaes normaes isolados. Note-se é ainda o periodo latente para o estro na femea castrada; assim, em R2 o estro só se manifestou após a terminação do estro na companheira normal; em R3, elle appareceu quando a normal já estava no seu 3º dia.

Emfim, estas experiencias suggerem uma serie de problemas que continuamos a investigar; mas o que já podemos considerar definitiva é a noção da passagem do hormonio ovariano de um animal para outro, em parabiose.

Nesse genero de experiencias, mais do que em qualquer outro, a qualidade tem muito mais importancia do que a quantidade. Nenhuma objecção pode ser feita á serie acima. As femeas castradas o foram cuidadosamente; por occasião da operação de parabiose, examinamos os uteros e verificamos a sua atrophia completa. O estro duradouro dos animaes não castrados, nós o interpretamos pela passagem do hormonio pre-hypophysario, que circula em grande abundancia nos animaes castrados.

Posteriormente, publicaremos o estudo macro e microscopico da genitalia interna dos animaes.

A QUESTÃO DA PLURALIDADE DOS HORMONIOS DO LOBO ANTERIOR.

Alem do hormonio ou hormonios da hypophyse anterior, que exercem um estimulo sobre as gonadas, EVANS e LONG (20) extrahiram do orgão substancias que exercem acção inhibidora sobre o estro das ratas.

Relativamente aos hormonios estimulantes que estudamos atraz, ha a assignalar, como effeitos os seguintes, nos animaes femeas, obtidos pelos varios autores citados:

1º Desenvolvimento dos folliculos ovarianos.
2º Formação de corpora lutea atresica.
3º Formação de corpora lutea, após ovulação.

Com a implantação de lobo anterior da hypophyse, os effeitos 1 e 3 predominaram. Pode-se, em determinados casos, provocar apenas o desenvolvimento dos folliculos, como é exemplo a figura 2.

Usando a urina de mulher gravida como fonte de material, encontra-se no camondongo, um aspecto macroscopico especial, que ZONDEK e ASCHHEIM denominaram "Blut punkte", isto é, pontos hemorrhagicos que se distinguem muito bem, a olho nú na superficie dos ovarios, e que são um elementos para seu bello processo de diagnostico da gravidez.

Com as implantações, nunca obtivemos "Blut punkte", donde concluimos que pelo menos elles não são frequentes como no caso da urina, o que tambem observou ENGLE (21).

A formação de corpora lutea atresica é a forma mais constante, quando se injecta urina. A reacção 1, de ZONDEK e ASCHHEIM, isto é, a maturação dos folliculos simplesmente, só raramente se observa com a injecção de urina.

C I C

Fig. 1—Puberdade precoce de camondongo infantil de 7,5 gr., aos lados dois controles. O animal foi implantado com 2 lobos anteriores de hypophyse de coelho. I—implantado. C—controles.

Fig. 1—Precocious sexual maturity, following 2 implantations of anterior pituitary of rabbit. I—7,5 gr. mous, implanted. C—Untreated controls.

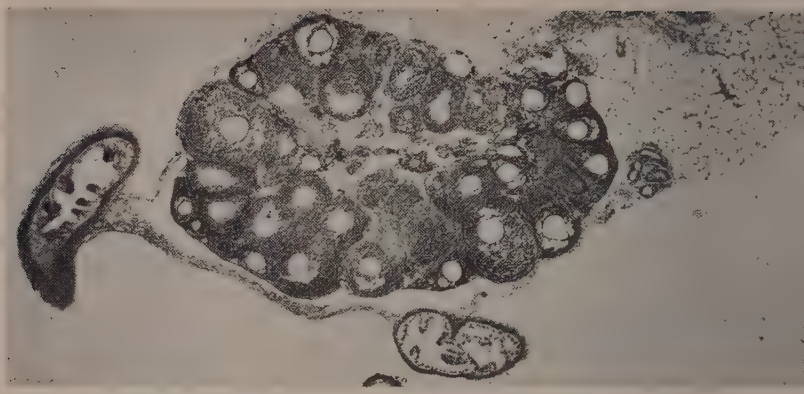


Fig. 2—Corte de ovario e trompa de um camondongo branco infantil de 7,5 grs.
Fig. 2—Cross section of ovary and tuba of an 7,5 grs., immature mouse.
1 × 45.

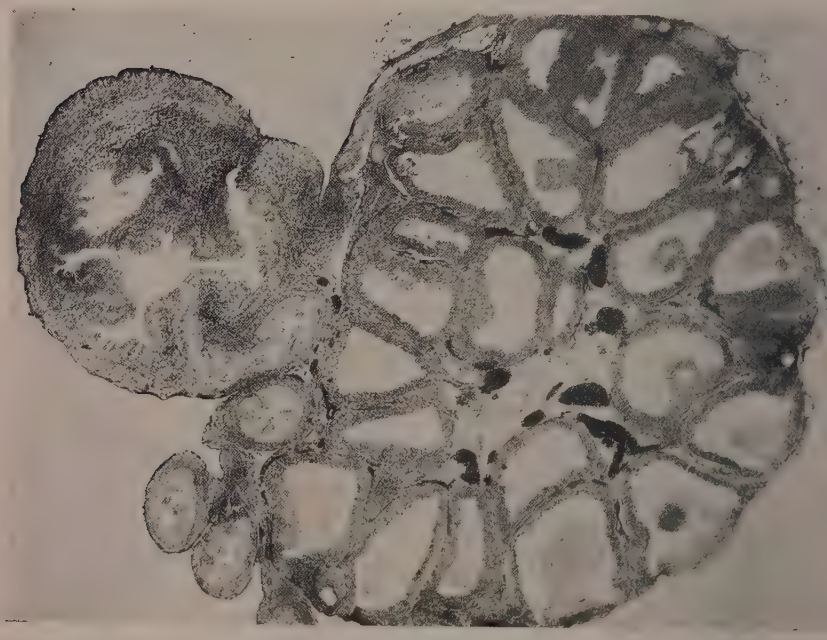


Fig. 3—Corte do ovario do animal implantado, visto na fig. 1.
Fig. 3—Cross section of the ovary, of implanted mouse shown in fig. 1.
1 × 45.

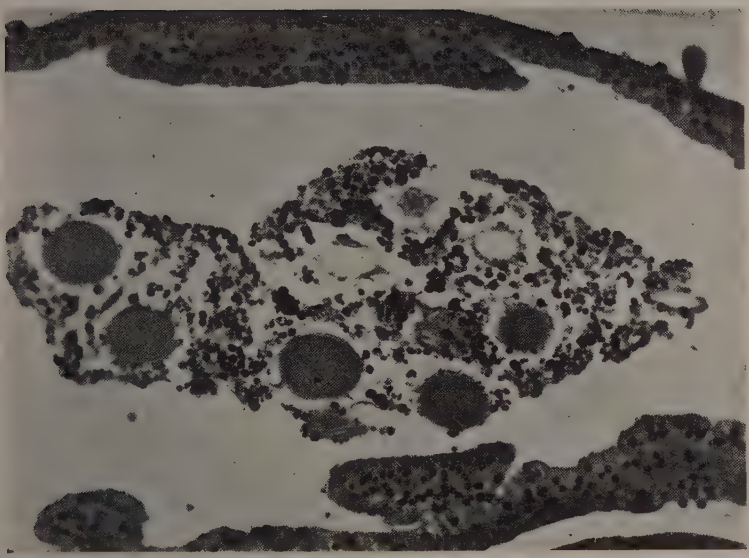


Fig. 4—Ovulos na trompa de um camondongo infantil de 7,5 grs., em puberdade precoce, 100 horas após a implantação de 1 lobo anterior de hypophyse de coelho.

Fig 4—Tubal ova ; precocious sexual maturity, 100 hours after one single implantation of 1 anterior pituitary of rabbit, in a 7,5 grs. mous.

1 × 220.

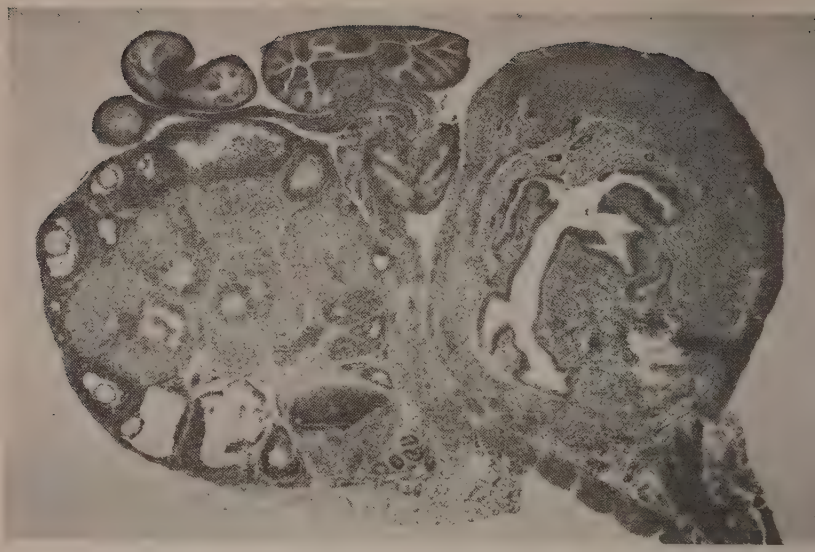
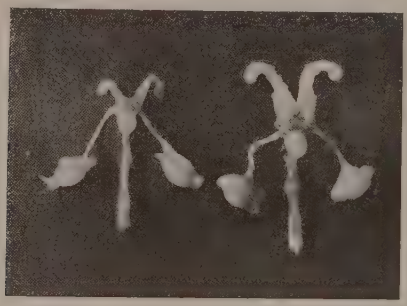


Fig. 5—Desenvolvimento dos folliculos, formação de corpora lutea atresica, folliculo hemorrhagico, após injecção de urina gravidica, dentro de um praso de 100 horas. Camondongo de 7 grs.

Fig. 5—Follicular development, corpora lutea atresica, hemorrhagic follicle, after injection of pregnant woman urine, in a 7 grs. mous. These changes are obtained within 100 hours 1 × 45.



C I

Fig. 6—Puberdade precoce provocada por 3 implantações de hypophyse anterior de coelho, em camondongo de 9 grs. Notar o desenvolvimento do penis e vesiculas seminaes. C—controle.

Fig. 6—Precocious sexual maturation, followiog 3 ant. hyp. of rabbit, implantations, in a 9 grs., male mous. Development of penis and seminal vesicles. C—control.

Nenhum argumento serio se pode invocar, para negar a identidade entre os hormonio hypophysarios eliminados na gravidez e os produzidos pela hypophyse.

Ha entretanto evidencias de variações quantitativas e qualitativas desses hormonios, conforme as situações physiologicas ou experimentaes.

Notadamente o factor atresiante domina na urina gravidica.

A elaboração de mais de um hormonio pelo lobo anterior é uma possibilidade perfeitamente rasoavel.

Até certo ponto, o antagonismo entre a ação estimulante do desenvolvimento follicular e a acção luteinisante, dão idea de um mechanismo muito bem adaptado para a regulação do cyclo ovarianno.

ASCHHEIM (22), recentemente, tende a admittir a pelo menos dualidade do hormonio, e assim tambem BRÜHL (23).

Do que observamos e pesquisamos, somos levados a concordar com esse ponto de vista; mas por emquanto nada podemos dizer de definitivo, e pensamos dar em breve conclusões mais seguras,

(Laboratorio de Physiologia do Instituto Oswaldo Cruz).

BIBLIOGRAPHIA

Ver no final da traducção ingleza.

Researches on the physiology of the anterior hypophysis and sexual glands

By THALES MARTINS, M. D.

(Assistent of the Oswaldo Cruz Institute).

The recent works of ZONDEK and ASCHHEIM (1), SMITH and ENGLE (2) established with full certainty the part played by the anterior lobe of the hypophysis as a regulator for sexual glands. It is a well known fact that the implantations of the anterior lobe of the pituitary body or the injection of certain extracts, induces in male or female immature animals precocious puberty to appear.

The sex, species or age of the donnor plays no rôle qualitatively, at least amongst mammals. The hypophysis of fowl do not give full results (SMITH and ENGLE, 2); LIPSCHÜTZ, KALLAS and WILKENS (3a) neither also those of Chilian frogs (kalyptocephalus) during the sexual stillness (LIPSCHÜTZ and PAEZ (3b) or even in the period of sexual activity (TH. MARTINS, 4) in brazilian frogs (Leptodactyllus). In the whole set of the above mentioned works, it is merely dealt with implantations effected on infantile rodents. However, HOUSSAY and GONZALEZ (5) observed testicular hypertrophy in normal or hypophyseoprived toads, after implantations of hypophysis of toad.

We may consider the stimulating rôle of the prehypophysis as general in mammals; similar results have been obtained in the most varied zoological groups, even in primates (ALLEN, 6).

The readiness and certainty of reaction of the ovaries in small rodents, in presence of the prepituitary, makes these a practical test material for researches of the kind, and has enabled to get a great number of most interesting verifications. In fact, ZONDEK and ASCHHEIM (7) could demostrate the enormous elimination of hormones from the anterior lobe during pregnancy, together with the ovarian hormone; and this fact is constant to such an extent, that its finding in urine constitutes nowadays the best process for an early diagnosis of pregnancy.

A noteworthy fact is that, besides man, it could be verified only in the chimpanzee.

HUMAN PUBERTY AND ELIMINATION OF HYPOPHYSEAL HORMONES.

During masculine puberty, in men, it may be found in urine, as reported recently by DE JONG, LAQUEUR and DINGEMANSE (8) in a summary.

We may confirm te fact, in feminine puberty. We carried out our research in 6 young girls, when the first menstrual symptoms were beginning to appear. In two of them, it was possible to demonstate the existence of prehypophyseal hormones in urine, by determining precocious puberty, when

injected in infantile mice (weighing from 6 to 7 gr.). In this case, positive results are decisive, whereas the negative are of no importance, since the exact moment is not known, when the elimination takes place; this may also be easily effected by systemic examination of urine, observing patients for a longer or smaller delay foregoing to the appearance of puberty.

HYPOPHYSIS AND THE "ALL OR NOTHING" LAW.

PEZARD (9) established the law of "all or nothing" for the endocrine function of testicles in fowl. He demonstrated that above a certain minimum quantity of testicle, animals are normal as regards sexual characters. Below such efficient minimum, the animal is equal to a totally castrated one. Intermediate types are not obtainable by a reduction of the testicular mass.

LIPSCHÜTZ and his co-workers (10) demonstrated that, in Guinea pigs, 1 °/o of the normal weight of testicles is sufficient to keep the penis and accessory glands at a normal level.

PEZARD extended to ovaries the law referred to; recent knowledge about ovarian hormone bring serious objections and reserves hereagainst; however, with regard to testicle, no available argumenl has been opposed.

In any case, the recent notions about the role of the anterior lobe, require a new verification of the law, specially with reference to the possibility of determining testicular hyper-function.

In fact, a factor of regulation being established, one understands easily that, by grafting several testicles on a normal animal, nothing supra normal is obtainable, as verified by PEZARD, and even, if the reduction of the mass is compensated by an hyper-secretion, in spite of unquestionable signs of hyper-function in the small remaining fragment not being found.

Under present circumstances, the law of "all or nothing" might be explained in the three following ways:

1o) The hypophysis acts in "all or nothing" that is to say, either does not stimulate, or determines in the testicle maximal reactions;

2o) The testicle reacts in "all or nothing", this meaning that, under the condition of existing a certain determined quantity of hypophyseal hormone, it will react to a maximum effect; it would remain indifferent to higher concentrations of hypophyseal hormone.

3o) The effector organs, (cock's comb, penis and glands of mammals) react "all or nothing'. Above a certain concentration of testicular hormones, they are indifferent.

By means of pituitary implantations or injection of active material, we can induce in the animal a condition of hyper-hypophysism.

SMITH and ENGLE implanted daily anterior pituitary bodies for a period of 15 to 35 days on adult rats. No increase of the weight nor changes in the structure of the genitalia of the animals were observed.

We effected 3 or 4 implantations or anterior lobe of rabbit hypophysis, on mice weighing 18 to 20 grams, during a period from 60 to 90 days, after which time the genital tract was examined. Our test was the size of the seminal vesicles and the weight of testicles. In 4 animals

weighing 18–20 grams, the size was 14,5 × 5 mm. (maximum length and width); 15 × 5; 20 × 4,5; numbers that remain within the normal limits. What we quote as "size index of vesicles" (11), the product of L × H, would in the above mentioned animals, respectively 72,5, 75 and 90. In normal animals, this index varies between 60 and 115.

The weight of the testis is not superior to the normal. We then injected hypophyseal hormones extracted from the urine of pregnant women, quite free from ovarian hormone and previously proved active for infantile animals. Even in this way, we were unable to obtain positive results, injecting three or four times a week about 5 to 10 ZONDEK–ASCHHEIM units every time. The experiment was effected in 3 mice weighing 20–23 grams.

We could not find histologically anything in the testicles that may demonstrate super-activity; but in one case of a cryptorchidic animal, the abdominal testicle developed an intersticial hypertrophy which was far above that usually observed in such condition. Either in our own collection of cryptorchidic testes, or in microphotographs found in works of various authors, none did show such plenty of interstitial elements. This is a fact which deserves further study, specially because, in the normally descended testicle, no intersticial reaction had been observed in animals, either implanted or injected.

To conclude, the technique as described did not enable us to induce in secundary sex organs, any development supranormal, that would account for a testicular hyper-function.

The question may be solved only by using a testis extract, perfectly active and sufficiently pure to be injected in increased quantities.

When a certainty may be got at, that an animal with an excess of testicular hormone in the circulation does mot react above the normal sexual morphology, as a "supermale", then it will be possible to determine the limits of reaction of the receptor organs.

CASTRATION AND HYPOPHYSIS.

It is known that after castration, the hypophysis becomes hypertrophied, and histological changes take place in the anterior lobe (FICHERA 12).

The hypophysis of castrated animals, when implanted on infantile, immature rats, show a greater activity than those from normal donnors (ENGLE, 13, EVANS and SIMPSON, 14).

In the absence of the gonads, thus, an increase of the hormones takes place in the gland. This fact might be explained by an accumulation of hormones, which should be secreted after the castratiou. But there are experimental evidences, that after removal of the gonads, they circulate in blood in detectable quantities.

MATSUYAMA (15) published years ago, a most valuable work, which, however, did not cause a great influence on the sequence of researches about sexual glands.

He joined in parabiosis, normal and castrated rats. The union of normal rats of the same sex does not involve any interesting genital change. But joining a castrated with a normal brings most important consequences.

And, in fact, the atrophy of the uterus, or of the penis and glands of the castrated specimen do not undergo any change by joining it with a normal female; but the genitalia of this latter suffer very serious changes. The ovaries grow considerably; they become cystic, and afterwards, richly luteinized. The uterus reaches enormous proportions. There is an hypertrophy and hyper-secretion which causes its distension.

GOTO (16) repeated and confirmed MATSUYAMA's experiments.

MATSUYAMA gave no explanation for these phenomena; GOTO admits the existence of "Kastrohormone", a substance secreted by castrated animals only; he injected blood of castrated rats in normal adult females, and observed genital alterations.

The present knowledge of the anterior pituitary enables us to throw some light upon such strange phenomena.

A most simple and logical explanation would be to assume that the circulating anterior lobe hormones are transferred from the castrated to the normal animal in parabiosis.

KALLAS (17) coupled in parabiosis infantile rats; castrated with normal females. After a few days, the latter arrive to eaarly pyberty, which is marked by maturation of the ovary, opening of the introitus and estrus.

KALLAS is the first author who alludes to the possibility of identifying with the hormone of the anterior lobe, the substance that circulates in the castrated rat, the so-called "kastrohormone" of GOTO; he sees besides as demonstrated in this experiment, that even in infantile animals, the hormone of the anterior lobe exists in circulation.

To this, we quite agree, inasmuch the identity of the said substance and the hormone of the anterior lobe is concerned. We object however, against the assertion of this experiment, proving that in young normal animals the said hormones are found really circulating.

One might suppose that, in the absence of the ovaries, that is to say, of the organs which normally retain the hypophyseal hormone, this would remain free accumulated in the circulation and could pass from the castrated to the normal animal in parabiosis. But in the case of the young specimens, its concentration in the blood is obviously below the limit that is necessary to determine the condition of puberty; and the small quantity that passes from one to the other, makes it uneasy to account for the constancy of effects, that is to say, the appearance of puberty in a rat weighing 15 to 20 grams, when normally it can appear only in an animal with a weight above 50 grams.

Injections of blood or blood serum also demonstrate the presence of hypophyseal hormones circulating in castrated infantile rats, in our experiments, as follows.

PRECOCIOUS SEXUAL MATURITY DUCED IN BY INJECTIONS OF THE BLOOD OF CASTRATED INFANTILE RATS.

Immature male and female albino rats were castrated, when weighing 25 – 30 grams. Eight days later, the blood, extracted by punction from the heart, was injected to infantile 25—30 grs. rats. The injection, made 2 or 3 times dayly, of 0,20 to 0,3 c.c. of blood or serum, induced in the injected animals the opening of the introitus and the estrus after

five days. In the ovary, the follicles are seen depeloped, and more seldom, there appears corpora lutea atresica. The injection of blood under the same conditions when extracted from infantile normal animals, does not induce these phenomena, even injecting higher dosis.

One might say that in infantile or adult animals, the ovaries retain the circulating hormone. But the blood extracted from the heart at a certain moment, did not pass entirely through the ovary.

An explanation which seems to us the most reasonable, is that in the castration, there may be an hyper-function or an precocious function of the hypophysis; the gonads exert an influence either direct or indirect on the pituitary body, thus existing consequently some mutual correlation between both glands.

From the above described facts, we may draw the conclusion that, after castration, the followlng effects are observed concerning the hypophysis; 1º) hypertrophy; 2º) increased hormones contents; 3º) these hormones circulate in notable amount in blood.

Pregnancy in primates is still an exemple of the influence of genitalia toward hypophysis; if it has not yet been possible to determine from where does start the stimulus for the huge discharge of hormones, as observed in such situation, it is obvious that, they should be at first located in the genitalia, and at certain moment, possibly also in placenta.

To afford a solution for the question, of early secretion or hyperfunction of anterior lobe after castration, we have some experiments in course, in which, the hypophysis of one or both of the animals in parabiosis has been removed.

THE ESTROUS CYCLE OF THE ALBINO RATS IN PARABIOSIS.

In MATSUYAMA and GOTTO's experiments, the atrophy of the uterus of the castrated animals undergoes no change when joined in parabiosis with normal animals. It would seem that the ovarian hormone does not pass from the normal to the castrated animal. This could be accounted for the presence of the uterus, vagina or other fixators organs in the body of the non castratad companion; in this way, the hormone secreted in the ovaries would all be absorbed by the organism of the normal animal. We had in view studying the estrous cycle of animals in parabiosis; to solve this last question, we coupled a castrated female to a normal female, whose uterus had been completely removed. But the experiment proved that this ablation was by no means necessary; the ovarian hormone passes in every case, as follows.

EXPERIMENTS

6 immature rats of the same litter were taken for experiments. When they attained to a weight of 35—37 grams, three of them were castrated. 25 days later, the parabiosis were effected, the weights were then 75—80 grs., the normal had previously demonstrated estrus cycles and the castrated were in diestrus. We undertook these in accordance with SAUERBRUCH-HEYDE's (18) technique: coelostomia. The abdominal cavities being opened, we sewed together the animals in three planes: peritoneum, muscle and skin. Cicatrization occured quickly and the animals lived harmonically that is, without any exterior sign that would point out anemia or plethora in any one of them. One normal and one castrated were kept free as controls.

R 2
Castrated
Hysterectomised
Days after parabiosis
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Leucocytes
Mucus
Nucleated cells
Keratinised cells
No material
Leucocytes
Mucus
Nucleated cells
Keratinised cells
R 3
Castrated
Normal
Leucocytes
Mucus
Nucleated cells
Keratinised cells
Leucocytes
Mucus
Nucleated cells
Keratinised cells

Days	Normal control				Castrated control			
	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	Keratinised cells	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	Keratinised cells
3	+++	++	–	–	+++	++	–	–
4	+++	+	++	–	++	+	.	–
5	–		+++	+++	++	+	++	
6	–	–	–	+++	+++	+++	+	. .
7	+	+++	+	–	++	+++	+	–
8	++	++	.	–	No material			
9	+	++	+	–	No material			
10	–	–	–	+++	+	+++	–	
11	–	–	.	+++	No material			
12	+++	++	++	–	+	+++	.	
13	+	+	–	+	–	+	.	–
14	+	+	++	–	+	++	+	–
15	–	–	–	+++	No material			
16	–	–	–	+++	+	++	+	–
17	+	+	+	–	No material			

The estrus cycle (LONG and EVANS, 19) was verified every day, in the usual way; when any doubt would prevail about its changes, the test was repeated 2 and even 3 times a day. In the table, there may be seeu day by day all the most characteristical appearances.

The couple R2 is formed by junction of a castrated to a normal rat; the latter's uterus was removed completely, in accordance with the reasoning already described. R3 represents the parabiosis example of a castrated together with a normal. The controls — normal and castrated — are stated aside in the table.

As is plainly seen, the non-castrated females enter into estrus, for a rather long time, little time after being joined with the castrated. In the couple R2, this stage of estrus could be kept up for a period of 6 days; R3 showed the same condition during 4 days.

But, a new and very interesting fact could be observed: the castrated also showed full signs of estrus, which proves the passage to it of ovarian hormone proceeding from the non-castrated companion. Even in the normal animal R3, which suffered no surgical change in its genital organs, the passage of ovarian hormone into the castrated effected itself richly. The uterus and other receptors were consequently no obstacle to the hormoneal interchange.

A fact worth of mentioning, is the intensity of the keratinization of the vaginal mucosa. As well in the parabiosed castrated as in the non castrated rats, the mass of keratinized cells filled plentifully the vagina, to such an extent as we never observed in isolated normal animals. We must note the latent period for the estrus in the castrated female; thus in R2, the estrus appeared only after it had ended in its normal companion; in R3, it appeared when the normal part was in its third day of estrus.

As a matter of fact, these experiments open the way to a number of problems which we go on trying to elucidate; still, we may consider as surely demonstrated the passage of the ovarian hormone from one animal to another in parabiosis.

In this kind of experiments, more than in any other, quality plays a more important part than quantity. No objection seems to be possible in respect of the above series. The castrated females were operated with the utmost caution; during the parabiosis operation, we took special care in examining the uterus of each rat and we are sure of its complete atrophy. The prolongated estrus of the non castrated animals is explained by the passage of the prehypophiseal hormone, which is found circulating in large quantity in the castrated animals.

We shall publish later the macro and microscopical study of the internal genitalia of the animals.

ON THE QUESTION OF THE PLURALITY OF HORMONES OF THE ANTERIOR LOBE.

Beside the hormones of the anterior hypophysis, which have a stimulating influence on the gonads, EVANS and LONG (20) extracted from the organ, substances which cause an inhibiting action on sexual estrus cycle.

In reference to the stimulating hormones, which we described before, we must point out in female animals the following effects, which were verified by the various authors we quoted:

1º) Development of ovarian follicles.
2º) Formation of corpora lutea atresica.
3º) Formation of corpora lutea, following maturation and rupture of the follicle.

When grafting the anterior lobe of the hypophisis, the effects stated in 1º and 3º prevail. In some determined cases, it is possible to induce only the development of follicles, an example of which we have in fig. 2.

When using as material the urine of a pregnant woman, it is found in the mouse, a special macroscopical aspect, which ZONDEK and ASCHHEIM have specified as "Blutpunkte" or hemorrhagic points, and which are plainly seen with the naked eye, on the surface of the ovaries. These are one of the elements in their most interesting process of diagnosis for pregnancy.

With implantations, we never obtained "Blutpunkte" from which we draw the conclusion that they, at least, are not so frequent as in the case where urine is used, as it was also observed by ENGLE, (21).

The formation of corpora lutea atresica is the most constant type, when injecting urine. The reaction n. 1, of ZONDEK and ASCHHEIM, that is to say, merely the maturation of follicles, is rarely observed when injecting pregnant women's urine.

No argument can earnestly be opposed, that would attempt to deny the identity between the hypophyseal hormones eliminated during pregancy and those produced by the hypophysis.

There are, however, evidences of quantitative and qualitative variations of these hormones, depending upon situations either physiological or experimental.

More particularly, the factor of atresia is the one that prevails in the urine of pregnant woman.

The elaboration of more than one hormone by the anterior lobe appears as a perfectly reasonable possibility.

Up to a certain point, the antagonism between stimulating action of the follicular development, and luteinizing action, suggests the idea of a mechanism perfectly adaptated to the regulation of the ovarian cycle.

Recently, ASCHHEIM, (22) tended to assume at least the duality of the hormones, as also BRÜHL (23).

Our own observations and researches, induce us to accept this point of view; however, at the present time, we are still unable to say anything sure, but we hope to be shortly in a position to express more ascertained conclusions.

(Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute)

BIBLIOGRAPHY

(1)—ZONDEK and ASCHHEIM—Deutsch. Med. Woch., 52, 343, 1926.
Zeits. f. Geburtsh. u. gyn., 90, 372, 387, 1927.
(2)—SMITH—Proc. exp. soc. biol. a. Med., 24, 131, 1926.
SMITH and ENGLE—Am. J. of Anat., 40, 159, 1927.
(3a)—LIPSCHÜTZ, and WILKENS—C. rend. Soc. Biol., 100, 28, 1929.
b) LIPSCHÜTZ and PAEZ—C. rend. Soc. Biol., 99, 693, 1928.
(4)—MARTINS, TH.—C. rend. Soc. Biol. ,101, 957, 1929.
(5)—HOUSSAY and GONZALES—Rev. de la Soc. Argent. de Biol., 5, 77, 1929.
(6)—ALLEN—Anat. rec., 29, 315, 1928.
(7)—ZONDEK and ASCHHEIM—Klin. Woch., 7, 831, 1928.
(8)—DE JONG, LAQUEUR and DINGEMANSE—Arch. Neerl. de Physiol., 14, 276, 1929.
(9)—PEZARD—J. Phys. et Path. Gen., 20, 700, 1922.
(10)—LIPSCHÜTZ, OTTOW and WAGNER—Pflügers Arch., 188, 76, 1921.
(11)—MARTINS, TH. and ROCHA e SILVA—C. rend. Soc. Biol. (Soc. bresil. de biol., seance 31-7-1929.
Instituto Oswaldo Cruz, Supplemento, pg. 196, 1929.
(12)—FICHERA—Arch. ital. Biol., 43, 405, 1905.
(13)—ENGLE—Am. J. Phys., 88, 101, 1929.
(14)—EVANS und SIMPSON—Am. J. Phys., 89, 371, 1929.
(15)—MATSUYAMA—Frank. Zeits. f. Path., 25, 436, 1921.
(16)—GOTO—Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 94, 124, 1922.
(17)—KALLAS—C. rend. Soc. Biol., 100, 979, 1929.
(18)—SAUERBRUCH and HEYDE—Münch. Med. Woch., pg. 153, 1908.
(19)—LONG aud EVANS—Anat. rec., 18, 241, 1920.
(20)—EVANS and LONG—Anat. rec., 21, 62, 1921.
(21)—ENGLE—J. Am. Med. Ass., 93, 276, 1929.
(22)—ASCHHEIM—Klin. Woch., 8, 425, 1929.
(23)—BRÜHL—Deut. Med. Woch., 55, 696, 1929.

Sobre o poder infectante da hæmolympha de mosquitos contaminados com o virus da febre amarella

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA

A observação dos differentes autores que estudaram a febre amarella indica que existe um certo intervallo entre a penetração do virus no mosquito é o momento em que esses insectos se tornam capazes de transmitil-o ao homem ou ao *M. rhesus*.

Esse periodo parece ser aquelle necessario para que o virus, que penetra no tubo digestivo do insecto, passe á cavidade coelomica e dahi ás glandulas salivares. Assim sendo poder-se-ia admittir que a hæmolympha tambem deve ser infectante.

Experiencias recentes de HINDLE (1) pareciam contrariar tal hypothese, pois esse autor, inoculando num *rhesus* pernas de 2 mosquitos infectados e noutro os corpos dos mesmos insectos, verificou que o primeiro macaco permanecia indemne ao passo que o ultimo succumbia a uma infecção typica. Dessa experiencia concluiu HINDLE "The results of this experiment indicate that the virus may be present in the organs of infected mosquitoes without necessarily invading the coelomic fluid".

Estudando o mesmo assumpto chegámos a resultado completamente diverso do de HINDLE, parecendo-nos que alguma causa de erro houve em suas experiencias e que tambem as pernas desses mosquitos não se achavam contaminadas por fezes. Nossas experiencias são as seguintes:

EXPERIENCIA 1. *M. rhesus* nº. 429 (21-5-29). Inoculado com uma emulsão de pernas de 10 mosquitos (6 infectados 33 dias antes do *rhesus* nº. 373 e 4 infectados 15 dias antes do *rhesus* nº. 405). Todos estes mosquitos tinham expellido gotticulas de fezes nos tubos em que se achavam e sobre os quaes tinham andado e assim seguramente haviam contaminado as pernas nasse material. Temperatura do macaco 38º,7 no momento de inoculação.

Nos primeiros dias a temperatura foi normal; no 8º dia subiu a 40º, sendo o sangue inoculado no *rhesus* nº. 444. Nos dias seguintes a temperatura foi de 39º e 39º,5. Em 1º de Junho o macaco apresentou 40º e no dia seguinte 39º,7. No dia 4 elle foi encontrado morto na gaiola. Apresentava na autopsia lesões typicas, confirmadas pelo exame histo-pathologico do figado, que demonstrou: necrose tão extensa das celiulas hepaticas que era quasi impossivel encontrar algumas intactas. Desarranjo das traves de HENLE, congestão e inclusões nucleares.

EXPERIENCIA 2. *M. rhesus* nº. 444 (29-5-29). Inoculado com 0,5 cc. de sangue do *rhesus* nº. 429. Temp. 39º. Durante 3 dias nenhuma alteração. Em 2 de Junho o macaco apresenta 39º,8, no dia seguinte 40º,2 e nos

(1) HINDLE, E. An experimental study of yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1929, XXII, 5, 417.

dias 4 e 5 a temperatura foi de 39º,8 e 39º,7. A 6 o macaco apresenta hypothermia. Foi sacrificado e na necropsia observámos lesões macroscopicas de febre amarella e tambem exame positivo do figado. Necrose, inclusões nucleares e congestão (TORRES).

Com o fim de verificar se a hæmolympha de mosquitos infectados contem de facto o virus achamos melhor colhel-a directamente no seio pericardico com a seguinte technica. Alimentavamos o mosquito com sangue e em seguida o anesthesiavamos com um pouco de ether. Uma vez conseguida a anesthesia, tomavamos o mosquito e o immobilisavamos fazendo-o adherir, pela face ventral, a um pequeno fragmento do esparadrapo preso a uma cortiça, que servia de mesa operatoria. Para fazermos a puncção collocavamos o supporte debaixo do microscopio binocular (occ. 4 e object. a_3—ZEISS). O ponto a ser punccionado, o espaço membranoso entre os 4º e 5º urotergitos (Figs. 1 e 2) era então esterelisado por cauterisação com um pequeno estylete de vidro aquecido. Para a puncção usavamos pipetas capillares de vidro, estereis (Fig. 3), que funccionavam perfeitamente, podendo-se com ellas retirar o liquido da cavidade pericardica do mosquito. A hæmolympha entra na pipeta mal esta penetra nessa cavidade. Si por accaso o estomago era perfurado durante a manobra para colher a hæmolympha, via-se-o immediatamente penetrar na pipeta e esta não era aproveitada na experiencia. As pontas das pipetas cheias de hæmolympha eram introduzidas em pequenos entalhes feitos na pelle do macaco com uma lamina Gillette.

Assim inoculámos o macaco por via intradermica com diversas dessas pipetas na experiencia que abaixo passamos a resumir.

EXPERIENCIA 3. *M. rhesus* nº. 501 (20-7-29). Inoculado com a hæmolympha de 8 mosquitos previamente alimentados com sangue de 3 macacos infectados. Nos 4 dias seguintes a temperatura manteve-se normal. No dia 25 de Julho se elevou a 40º,3, no dia seguinte subiu a 40º,7 e no dia 27 o macacq apresentava 37º pela manhã, vindo a morrer á tarde.

As lesões macroscopicas eram typicas e o exame histopathologico, feito pelo Dr. TORRES, revelou no figado lesões absolutamente typicas de febre emarella. Nós tambem procurámos provar que os mosquitos usados nesta experiencia estavam seguramente infectados, inoculando um *rhesus* (502) com uma emulsão desses insectos. Este macaco veio a morrer depois de ter apresentado febre no dia 27 com lesões macro e microscopicas absolutamente typicas de febre amarella.

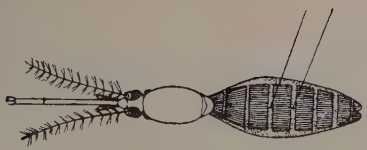


Fig. 1

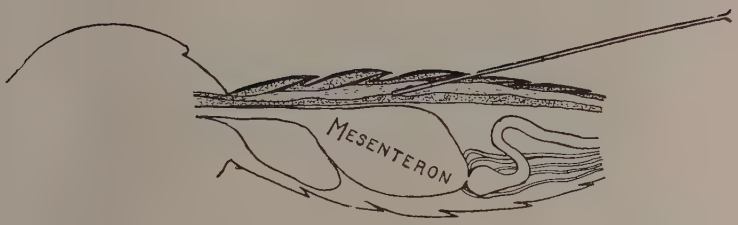


Fig. 2

Fig. 3

Figs. 1 e 2. Schemas para mostrar os pontos preferidos na puncção do seio pericardico e como esta é realisada.

Fig. 3. Micropipeta usada na puncção do seio pericardico dos mosquitos (um pouco augmentada).

Figs. 1 and 2. Schemes for showing the best places to reach the pericardial chamber and how it is punctioned.

Fig. 3. Capillary pipette employed for punctioning the pericardial chamber of mosquitoes.

On the contamination of hæmolymph in mosquitoes infected by the yellow fever virus

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A. da COSTA LIMA

The observations of all the authors who studied yellow-fever transmission seem to indicate that after the virus has been taken into the mosquito's intestinal tract, a certain number of days must elapse before the insect is able to transmit it by its bites to man or to *M. rhesus*.

This period might well be explained as representing the time required for the germ to pass from the mosquito stomach to the coelomic cavity and hence, carried by means of the hæmolymph, to the salivary glands.

It follows from this hypothesis that the virus should be found in the coelomic fluid or, in other words, that this fluid should also be capable of infecting a monkey.

This hypothesis therefore was recently opposed by a very interesting experiment of HINDLE (1). He inoculated two monkeys, one with the legs containing hæmolymph of two mosquitoes infected sixty four days previously, and the other with the rest of the body. This monkey died of yellow fever four-and-a-half days later, whilst the first was not infected. 'The results of this experiment indicate that the virus may be present in the organs of infected mosquitoes without necessarily invading the coelomic fluid" (HINDLE).

Nevertheless, the experimental criterium adopted by HINDLE for reaching such a conclusion does not hold good after the results we obtained with mosquito's excreta. It might have failed if the experiment had given a countrary result and induced him to conclude to the infectious nature of the hæmolymph. We believe that the legs of the 2 mosquitoes used by HINDLE were not contaminated by excreta at the moment of the experiments.

We may draw this conclusion after having repeated his experiment but with legs of mosquitoes contaminated by excreta a few moments before the inoculation.

EXPERIMENT 1. *M. rhesus* nº. 429. This monkey received, on May 21, subcutaneously a few cc. of an emulsion of legs of infected mosquitoes in sterilized water. We used 10 mosquitoes, 6 contaminated on *rhesus* nº. 373, 33 days previously and 4 that had been fed on infected *rhesus* nº. 405, 15 days before. All these mosquitoes had expelled many droplets of excreta on the wall of the tubes and walked freely on these contaminated material.

After having etherized them, we take off their legs and prepared an emulsion.

---

(1) HINDLE, E. An experimental study of yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1929, XXII, 5, 417.

Temperature of inoculated *rhesus*: 38°7.

On the first days the temperature was normal. On the 29th, 8 days after the inoculation, it rose in the afternoon to 40°. The monkey then was bled and its blood injected into *rhesus* n°. 444. On the 2 following days the temperature fell to 39° and to 39°.5. On June 1, a new rise to 40°, falling the next day to 39°.7. On June 4 we found the monkey dead in its cage. The autopsy and the histo-pathological examination of the liver showed typical lesions of yellow fever. The result of this last examination was given by TORRES in the following terms: "Necrosis of the liver cells so extensive that it was almost impossible to observe normal ones. Disarrangement of the columns of hepatic cells. Congestion. Nuclear inclusions".

EXPERIMENT 2. *M. rhesus* n°. 444. Inoculated on May 29th with 0.5 cc. of blood withdrawn from *rhesus* n°. 429. Temp. 39°. On the 3 following days after the inoculation the temperature remained normal. On June 2 rose to 39°.8. On June 3, 40° 2, on June 4, 39°.8 and on June 5, 39°.7.

On June 6, at 11 a. m., when the temperature was very low, the monkey was killed. The autopsy and the histo-pathological examination revealed the presence of typical lesions of yellow fever. The result of this last examination was the following: "Nuclear inclusions in hepatic cells. Necrosis. Congestion" (TORRES).

In order to verify if the hæmolymph of infected mosquitoes contains the yellow fever virus or is free from it we considered better to withdraw that fluid directly from the pericardial chamber, where it flows more abundant, principally inside the dorsal vessel, by adopting the following technique. After having fed on blood, the infected mosquito is etherized and its wings and legs cut off. We stick it then firmely, ventral side downwards, to the glueing face of an adhesive tape, mounted on a piece of cork plate, serving as operating table. The punction of the pericaldial chamber is by its nature a microscopic operation and it is indispensable for its performance to use a binocular microscope giving a magnification of about 60 diameters (occ. 4, object. a_3—ZEISS).

The region to be punctioned, the membranous space between the 4th and 5th tergites (figs. 1 and 2), must be sterilized by cauterizing it with the point of a heated glass stylet. For the punction we use glass tubes, drawn out a few moments before the operation so as to form a micropipette (fig. 3). With carefull handling of this micropipette it is not dificult to reach to the pericardial chamber, what is ascertained by the rising of hyaline fluid in the pipette, immediately after the perforation of the intersclerital membrane. If by an intempestive handling of the pipette the stomach is perforated, instead of a clear fluid, we get blood, easely distinguished by its color. The end of the micropipette, filled with hæmolymph, is introduced under lens control in a cut of the skin of the *rhesus* made by a Gillette blade. We thus make an intradermal inoculation of the fluid, the monkey being inoculated by several micropipettes introduced in various cuts.

EXPERIMENT 3. *M. rhesus* n°. 501. Temperature 39°.1. Inoculated on July 20 with the hæmolymph of 8 mosquitoes previously fed on blood of 3 infected monkeys. On the 4 following days the temperature remained nor-

mal. On July 25 it had risen to 40°.3. On the next day, 40°.7. On July 27, 37° in the morning. The monkey died at noon of this day. The histo-pathological examination of the liver made by Dr. TORRES showed typical lesions of yellow fever.

We also tried to prove the infective action of the mosquitoes used in this experiment by inoculating the *rhesus* n°. 502 with an emulsion of their bodies. This monkey showed the rise of fever on July 24 and 25, the temperature falling the next day to 38°.9. On the 27th we found it dead. The histo-pathological examination of the liver also revealed typical lesions of yellow fever.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

Considerações sobre a musculatura dos segmentos terminaes da perna de alguns insectos e sobre a funcção do chamado ORGÃO TARSAL. (1)

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

No fasciculo 8 do *Boletim Biologico*, de 18 de Agosto de 1927, ha um artigo do Prof. CEZAR PINTO sobre a presença de um estigma respiratorio no articulo apical do tarso de alguns insectos por elle examinados.

Quando li o referido artigo, pouco tempo depois de publicado, escrevi uma carta a esse distincto collega dizendo-lhe que certamente houvera algum equivoco em sua observação, por não ser possivel a presença de um orgão respiratorio dessa natureza nas pernas dos insectos.

Mais tarde, quando aqui nos encontrámos, fiz-lhe vêr a conveniencia de revêr o seu trabalho, estudando novamente o orgão que havia considerado um estigma e que devia ter uma funcção especial, talvez mesmo ainda não assignalada pelos autores.

CEZAR PINTO, occupado então com trabalhos mais interessantes, adiou para mais tarde a execução de pesquizas nesse sentido, que, estou certo, lhe forneceriam dados seguros para melhor ajuizar a funcção do orgão em questão.

Ha pouco tempo elle recebeu do Prof. S. de TOLEDO PIZA JUNIOR um exemplar do ultimo numero da *Revista de Agricultura*, contendo um artigo desse Professor, intitulado: "Sobre um dispositivo pouco conhecido para a movimentação das garras de *Haematopinus suis* L".

Nesse artigo TOLEDO PIZA assignala o equivoco observado no trabalho de CEZAR PINTO, aliás evidente nas figuras apresentadas pelo autor, mostrando que o orgão tarsal por elle observado não é um estigma, como tambem não é trachéa o filamento com que se relaciona e, finalmente, apresenta uma interpretação respeito á funcção desse orgão.

Não podendo CEZAR PINTO, no momento, retomar a questão, por estar revendo as provas do seu livro sobre Parasitologia Medica, pedio-me que a examinasse, publicando os resultados a que chegasse.

A par das pesquizas que tive de realisar, procurei ler a bibliographia sobre o assumpto. Dentre os varios trabalhos que pude consultar sobre a anatomia da perna dos insectos, devo citar, como mais desenvolvidos na parte relativa ao orgão tarsal, os de DAHL e de OCKLER.

No trabalho de LAURA FLORENCE sobre o *Haematopinus suis* (L.), no de STRÖBELT sobre o *Linognathus vituli* (L.) (= *Pediculis tenuirostris* BURM.), embora se encontrem boas descripções da musculatura das pernas desses piolhos, ha apenas ligeiras referencias ao alludido orgão. Em

(1) Apresentado a Academia Brasileira de Sciencias, em sessão de 10 de Setembro de 1929.

outros trabalhos, cuja relação se encontra na parte bibliographica desta nota, ou elle é apenas assignalado nas descripções ou figuras apresentadas, ou os autores, descrevendo o funccionamento do mesmo, fazem-no seguindo uma opinião anterior. Comtudo, todos os pesquizadores são acórdes em consideral-o como uma estructura elastica destinada a distensão da garra. D'ahi o nome pelo qual é conhecido desde 1884, quando DAHL o designou *Streckplatte* ou *stipes extensor unguim.*

TOLEDO PIZA, baseando-se nas pesquizas de LAURA FLORENCE sobre os musculos e respectivos tendões da perna de *H. suis* e nas que poude executar, considera-o com funcção diversa, isto é, analogo a uma mola, que mantem a garra contrahida quando o musculo tibial se acha em repouso. A distensão da garra seria, pois, activa e obtida, como procurou demonstrar FLORENCE, pela contracção do musculo tibial (*extensor muscle* de FLORENCE) sobre o dispositivo tarsal.

A funcção e mecanismo por elle expostos poderiam ser admissiveis, caso a descripção e figuras que apresentou das pernas de *H. suis* representassem exactamente o que de facto se encontra na extremidade desses appendices locomotores. Entretanto aquellas indicam que TOLEDO PIZA fez um exame incompleto da região, pelo qual não lhe foi possivel chegar a resultados inteiramente de accordo com a disposição real das estructuras observadas.

Acho que TOLEDO PIZA deveria ter proseguido nos seus estudos, sem entretanto abandonar, como fez, por considerar impracticaveis, os processos de techica usuaes nas pesquizas anatomicas. Ao meu ver o methodo que adoptou em suas pesquizas deve alterer consideravelmente as estructuras mais delicadas que se encontram dentro das pernas de um insecto, pois elle trata o material, depois de fixado, lavado e deshydratado, pela essencia de cedro, aquecida á ebulição e até que a mesma adquira um tom vermelho queimado.

SOBRE A MUSCULATURA DAS PERNAS DOS PIOLHOS

Em minhas pesquizas examinei pernas de *Haematopinus suis* (L.) e de *H. eurysternus* (NITZSCH). Para exames comparativos observei tambem os musculos das pernas de formas jovens de *Empicoris peregrinator* (L.), de *Cimex hemipterus* L., de alguns hemipteros (chermideos e aphidideos).

O material foi estudado pelos seguintes processos:

Exame de pernas integras ou dissecadas, montando o material em meio aquoso ou em glycerina.

Exame de pernas integras depois de fixadas, coradas, deshydratadas e devidamente clarificadas, montando-as em balsamo do Canadá.

Secções transversaes do tarso, ao nivel do orgão tarsal, usando material previamente fixado, executando-as com lamina Gillette sob o binocular. Secções longitudinaes, collocando a perna do insecto entre duas laminas, encostando-a a uma lamina espessa previamente colada a uma das laminas e cortando-a, ao longo do eixo longitudinal da perna, por meio de uma Gillette que se faz deslisar entre as 2 laminas até o bordo da laminula.

Finalmente, córtes histologicos, fixando o material pelo ZENKER acetico, tendo o cuidado de tratal-o, depois da lavagem, por um amolecedor da chitina (diaphanol ou segundo a technica do nitrito de sodio aconselhada por DRAHER).

Alem dessas pesquizas, relativas a estructura das regiões que devia examinar, fiz tambem algumas de ordem physiologica, para estudar os movimentos das garras dos piolhos e phenomenos correlatos.

Deti-me um pouco mais no exame da tibia e do tarso da perna de *H. suis*. Pude, assim, tambem observar a disposição das trachéas e acompanhar as principaes ramificações do nervo tibial.

Como, porém, no momento, só interessa a parte referente a musculatura, analysarei resumidamente, nas linhas que se seguem, o que sobre ella se tem escripto, assignalando o que me parece falho na observação dos autores.

Deixando de lado a musculatura dos primeiros segmentos da perna, em geral bem descripta pelos autores e, no caso especial dos pediculideos, por LANDOIS, STRÖBELT, OCKLER, OSBORN, MÜLLER e FLORENCE, passarei a considerar a musculatura do femur

Encontram-se ahi, como mostraram LANDOIS e STRÖBELT, 3 musculos e não dois, como vio FLORENCE.

1º. *Flexor* ou *adductor da tibia*, constituido por um feixe que atravessa o femur da base ao apice, parallelamente ao longo eixo, com o qual se relacionam cerca de 6 feixes musculares, que se inserem, em intervallos approximadamente iguaes, de cada lado, na parte dorsal do femur, desde um pouco alem do meio do femur até a curvatura basal. Todos esses feixes se dirigem para baixo, para diante, e, reunidos ao feixe longitudinal inferior, se fixam por meio de um tendão na parte ventral da articulação femur-tibial no apodema tibial que ahi se encontra.

2º. *Extensor* ou *abductor da tibia*, constituido por feixes musculares que percorrem longitudinalmente a parte dorsal, inserindo-se, de um lado na articulação do femur com o trochanter e na parede dorsal e proximal do femur e do outro, por meio de um tendão, na parte superior da articulação femur-tibial.

3º. Entre os 2 musculos citados, ao longo do meio do femur, ha um outro constituido por 2 feixes relativamente finos, de inserção basal, que terminam, um pouco antes da articulação femur-tibial, n'um tendão relativamente espesso. Este se dirige para a parte ventral da articulação femur-tibial, onde se relaciona com os grossos troncos trachéaes e com o tronco nervoso que por ahi passam e, encostando-se depois ao apodema basal da tibia, vae se unir ao flexor da garra.

A presença deste musculo na perna do *Haematopinus* nada tem de extraordinario, pois elle representa o *feixe proximal* ou *femural* do *longo flexor de garra*, perfeitamente distincto do *feixe distal* ou *tibial*, ambos observados em quasi todos os insectos. Tive o ensejo de aprecial-os mais nitidamente nas pernas dos 2 hemipteros citados e de alguns dos homopteros que tambem examinei nas minhas pesquizas. Nestes insectos vê-se nitidamente o tendão do longo flexor originar-se no femur, percorrer toda a tibia e tarso sob a forma de um longo filamento, que se relaciona com o orgão tarsal, dando inserção, ao passar pela tibia, aos feixes distaes.

Nas photomicrographias ns. 1 a 2 vê-se nitidamente o referido tendão.

A musculatura da tibia, é constituida por varios musculos que devem tambem desempenhar funcções differentes.

Na parede dorsal da tibia inserem-se, de cada lado, em intervallos muito approximados e aquem do meio para a articulação femur-tibial, 4 feixes musculares. Os 3 distaes superiores, que se dirigem obliquamente para a extremidade distal, reunem-se com o proximal, mais expesso e inferiormente situado e com os do lado opposto. Ao longo do eixo longitudinal da tibia, esses feixes encontram 2 outros inferiores que se inserem na paparede ventral (um de cada lado) abaixo do apodema basal da tibia, tambem dirigidos obliquamente para a extremidade distal deste segmento.

O tendão que passa do femur para a tibia, ainda bem chitinisado ao passar pelo apodema tibial, expande-se pouco adiante n'uma membrana que envolve a massa muscular inferior, continuando-se n'um outro envoltorio membranoso, reforçado no centro pelo tendão que vae terminar no orgão tarsal. Este tendão, a principio um simples espessamento desse envoltorio, a proporção que se approxima do orgão tarsal, vae adquirido mais consistencia para se apresentar, na sua porção distal, com o aspecto de uma corda relativamente espessa e roliça que se insere na parte superior do extremo proximal do orgão tarsal. Na sua porção proximal está em relação não sómente com os musculos tibiaes contractores da garra, que devem ser os feixes de inserção ventral, como com o tendão que penetra na tibia, oriundo dos musculos femuraes.

Os feixes que se inserem na parede dorsal da tibia, especialmente os 2 grossos feixes inferiores, da inserção juxta-articular, e que atravessam a tibia, da base ao apice, formando um Y de abertura voltada para a extremidade proximal da tibia, quando se examina o segmento pela parte dorsal, devem ser os extensores da garra.

A presença de um musculo extensor da garra é negada pela maioria dos autores que consideram todos os musculos da tibia como um contractor da garra. Apenas FLORENCE e TOLEDO PIZA classificam a totalidade das massas musculares da tibia como um só musculo extensor.

Não me foi possivel consultar o trabalho de OSBORN sobre o *Haematopinus suis*, de modo que não posso julgar o que elle escreveu — e que me parece certo — a respeito dos musculos tibiaes, senão pela seguinte passagem de FLORENCE:

"OSBORN figured this large muscle (ella se refere indubitavelmente ao musculo tibial) lying in the tibia as inserted in the dorsal wall of the tarsus, and a continuation passing from there to the dorsal curve of the claw. He also figured a flexor muscle of the tarsus".

As pesquizas que fiz autorizam-me, entretanto, a assignalar na tibia dos pediculideos, não sómente um extensor e um flexor da garra, como tambem a existencia de um flexor da tibia. O extensor da garra está em relação, na parte distal (tarsal), com um tendão achatado que passa acima do orgão tarsal para se inserir, após se ter bifurcado, na base da curva dorsal da garra. A base da curva ventral da garra está ligada, por um forte ligamento, a extremidade distal do orgão tarsal e este, pela sua extre-

midade proximal, ao tendão do flexor. A bainha ligamentosa que envolve os musculos tibiaes emitte tambem prolongamento ventraes, sob o tendão do flexor da garra, que se inserem no fundo e no assoalho esclerosado da *cavidade tarsal.*

Quanto ao musculo *flexor do tarso*, precisamente o que FLORENCE chama de "retractor of the disc": trata-se de um fino musculo que, emergindo do meio da massa dos musculos tibiaes, emitte um tendão de 2 cordas justapostas, que se dirige obliquamente ao apice da tibia e se insere no extremo proximal do apodema tarsal e não ha base do disco protractil (1), como imaginou FLORENCE. A impressão que se tem deste pequeno musculo retractor do tarso é de que elle não deve ter uma acção apreciavel e dahi ser praticamente immovel a articulação tibio-tarsica.

SOBRE O ORGÃO TARSAL (STRECKPLATTE).

A estructura do tarso dos insectos foi estudada por varios autores, porem, inbitavelmente os melhores trabalhos de conjuncto são os de DAHL e de OCKLER.

No que respeita a anatomia do tarso dos pediculideos a descripção que me parece mais perfeita é a de OCKLER relativa ao *Phthirus pubis* (L.)

Como já disse foi DAHL quem, pela primeira vez, estudou detalhadamente o orgão tarsal, assignalando as relações que elle mantem com o tendão do flexor da garra e com a propria garra e considerando-o como um orgão destinado a distensão da garra (Streckplatte). Verificou tambem a presença, no apice do tarso, de uma cavidade, que se communica com o exterior por uma abertura ao nivel da base da curvatura ventral da garra e que se prolonga internamente até o meio do tarso. Descreveu ainda a forma e o revestimento fortemente chitinisado do assoalho dessa cavidade, monstrando tambem que o tecto da mesma é principalmente occupado pela face ventral do orgão tarsal, que se pode deslocar livremente na cavidade, dada a elasticidade das ligações que o prendem ao tecto.

OCKLER, confirmando e completando as observações de DAHL, deteve-se não só no estudo da "Streckplatte" como no da gotteira esclerosada da referida cavidade—"Gleitrinne"—aliás já anteriormente estudada por GRABER.

Acredito que se elle tivesse examinado mais cuidadosamente esta ultima estructura, não teria considerado o orgão tarsal, como os autores que o precederam e os que o seguiram, como um dispositivo para a distensão da garra, ou para contracção, na interpretação de TOLEDO PIZA. Bastaria sómente comparar a posição do orgão tarsal em relação com a gotteira tarsal, quando a garra está retrahida ou quando ella se acha distendida (figs. 9 e 10), para comprehender que elle não deve actuar na movimentação da garra.

---

[1] Esta formação, designada por ENDERLEIN sob o nome de "Prätarsalsklerit" não deve ser confundida com o *onychium* [empodium, pulvillus, de outros autores] que se acha num dos lados da extremidade do tarso e que, no *H. suis*, é perfeitamente visivel sob a forma de uma lingueta triangular ponteaguda, apresentando um espinho basal recurvado para a ponta do onychium (v. fig. 4).

Se OCKLER tivesse tambem notado a superficie aspera da "Gleitrinne", eriçada de finissimos dentes negros e sabendo que sobre essa gotteira, com os movimentos de contracção e de extensão da garra, attritava a face ventral estriada da "Streckplatte", certamente concluiria que se tratava de um simples dispositivo estridulatorio. De facto a "Streckplatte" ou simplesmente o *orgão tarsal*, não é senão a *radula* desse apparelho estridulatorio, que funcciona de modo um tanto analogo ao instrumento, creio que de origem africana, a que nós damos o nome de "réco-réco". Cheguei a este resultado após ter examinado pernas recentemente amputadas de piolhos jovens, com as quaes, por transparencia, podia observar ao binocular os movimentos da garra. Notei assim que o orgão tarsal, com a contração da garra (acto indubitavelmente tão activo como o da distensão), retrahe-se completamente na cavidade tarsal, e com a distensão, fica em grande parte exposto (v. fig. 10). Observei tambem que, nos movimentos de vae e vem da garra, a forma do orgão tarsal mantem-se a mesma, nem se distendendo nem se retrahindo. Já suspeitando da sua verdadeira funcção, passei a examinar, com forte augmento, as secções longitudinaes e transversaes do tarso ao nivel da gotteira tarsal e assim pude ver as finissimas pontas negras, ha pouco citadas, que emergem da cuticula da gotteira e que, embora muito delicadas, devem apresentar uma rigidez consideravel, pois se originam profundamente na espessura da parede da cavidade, como se pode ver bem examinando cortes feitos ao nivel das duas placas lateraes, fortemente esclerosadas, que constituem a "Gleitrinne". Aliás, só o facto de se observar esta gotteira bem desenvolvida nos tarsos que tambem apresentam um orgão tarsal bem desenvolvido, deveria ter despertado a attenção dos pesquizadores. Nos hemipteros que estudei observam-se as duas formações, perêm ambas muito menos desenvolvidas que nos pediculideos. Assim no pentatomideo *Empicoris peregrinator* (L.) a placa estridulatoria ("Streckplatte"), em vez de ser transversalmente estriada, é simplesmente escamosa, como aliás DAHL e OCKLER já haviam observado em outros insectos, e a gotteira apresenta a superficie aspera porém não denteada. Mesmo nos pediculideos a denticulação é ás vezes imperceptivel, mormente em se tratando de formas jovens.

Faltava-me apenas verificar experimentalmente e producção de ruidos estridulatorios. Depois de ter experimentado sem resultado apreciavel os methodos de JANET e de SANTCHI para a precepção de sons de fraca intensidade produzidos pelas formigas, lembrei-me de usar o seguinte, que, se não é o mais perfeito, tem a vantagem de ser muito simples. Tomo dois tubos de borracha com 10 cm., de comprimento, pouco mais ou menos, por 1 cm., de diametro. Num dos orificios de cada tubo colloco um piolho no meio de alguns fios de algodão, fechando-o depois com um rolha. N'um tubo colloco um piolho perfeito e no outro um especimen com os tarsos amputados na base do orgão tarsal. Os dois tubos são introduzidos pelas extremidades abertas nos conductos auditivos de modo a ficarem suspensos e sem que haja qualquer attrito. Do tubo em que se acha o piolho mutilado ouve-se um ruido muito fraco, quasi imperceptivel, resultante do attrito do corpo do insecto com os fios de algodão. Do outro, porém, além desse ruido, ouve-se nitidamente, de quando em vez, e ás vezes seguidamente, uma crepitação especial que deve ser a estridulação

produzida pelo orgão tarsal. E' indispensavel collocar o piolho numa trama de alguns fios de algodão ou em um pello do animal em que vive, pois, se o deixarmos sobre a rolha ou se o montarmos n'uma agulha, fincando-a no dorso do abdomen e montando-a na rolha, de modo a que as pernas se movam livremente, não se ouvirá ruido algum. Isso porque, se o piolho não tiver um pello para se movimentar, como o faz em condições normaes, isto é, deslocando-se mediante movimentos da garra de encontro a tibia, elle se mantem sempre com a garra distendida, como se pode ver bem observando um piolho deslocar-se sobre uma lamina de vidro.

Pretendo, logo que tenha novo material, melhorar as condições da experiencia usando um microphone especial, typo Hughes, ligado a um ampliador de radio, de modo a tornar bem perceptiveis os ruidos produzidos por especimens perfeitos e mutilados, para a devida comparação, e, se conseguir melhores resultados, communical-os-ei opportunamente.

BIBLIOGRAPHIA

LANDOIS, L. 1864. Untersuchungen über die auf den Menschen schmarotzenden Pediculiden. I. Anatomie der Phthirius inguinalis Leach. Zeitschr. f. wiss. Zool. **14**: 1—26. Taf. I—V.

STRÖBELT, O. 1882. Anatomie u. Physiologie v. Haematopinus tenuirostris. Inaug. Dissert. Münster. Düsseldorf. Traduzido por DALLAS (1883): Ann. Mag. Nat. Hist. **5**: 11:73—108. Pl. III.

DAHL, F. 1844. Beiträge zur Kenntniss des Baues und der Funktionen der Insektenbeine. Arch. f. Nat. **52**: 146 – 193. Taf. XI—XIII.

SIMMERMACHER, G. 1884. Untersuchungen über Haftapparate an Tarsalgliedern von Insekten. Zeitschr. f. wiss. Zool. **40**: 481 – 556. Taf. XXV—XXVII.

GRABER, V. 1885. Über die Mechanik des Insektenkörpers. Biol. Centralbl. **4**: 560—570.

JORDAN, K. 1888. Anatomie und Biologie der Physapoda. Zeitschr. f. wiss. Zool. **47**: 541—620. Taf. XXXVI—XXXVIII.

OCKLER, A. 1890. Das Krallenglied am Insektenfuss. Archiv. f. Naturgesch. **56**: 221—262. Taf. XII—XIII.

OSBORN, H. 1891. The hog louse. No folheto: "The Pediculi and Mallophaga affecting man and the lower animals. U. S. Ent. Div. Bull. **7**: 18—21 (*Não consultado*).

ENDERLEIN, J. 1904. Läusestudien. Über die Morphologie, Klassification, und systematische Stellung der Anopluren nebst Bemerkungen zur Systematik der Insekten-Ordnungen. Zool. Anz. **28**: 121 – 147.

WOODWORTH, C. W. 1908. The leg tendons of insects. Amer. Nat. **42**: 452 – 456.

MJÖBERG, E. 1910. Studien über Mallophagen und Anopluren. Ark. f. Zool. **6**: 1—296. Taf. I—V.

MÜLLER, J. 1915. Zur Naturgeschichte der Kleiderlaus. Oesterr. Sanitätsw. **27** 36—38 1—63.

TULLGREN, A. 1918. Zur Morphologie und Systematik der Hemipteren I. Entom. Tidsk. **39** : 113—133. Fig. I—II.

FLORENCE, L. 1921. The hog louse *Haematopinus suis* LINNE; its biology, anatomy and histology. Cornell Univ. Agric. Exper. Sta. Mem. **51** : 641—725, Pl. LVIII—LXVI.

PINTO, CEZAR. 1927. De la presence d'un stigmate respiratoire sur les tarses du *Cimex hemipterus*, *C. lectularius*, *Pediculus humanus*, *Haematopinus eurysternus* et chez les larves de *Triatoma megista*. Bol. Biol. **8** : 115—128, Fig. 1—12

TOLEDO PIZA JOR, S. de. 1929. Sobre um dispositivo pouco conhecido para a movimentação das garras no *Haematopirus suis* L. Rev. Agricult. **4** : 219—223. Fig. 1—7.

WEBER, H. 1929. Biol. Untersuchungen an der Schweinelaus (*Haematopinuis sus* L.) unter besonderer berüchsichtigung der Sinnesphysiologie. Zeitschr. f. wiss. Biol. Abt. 6. **9** : 564 – 612.

Fig. 1

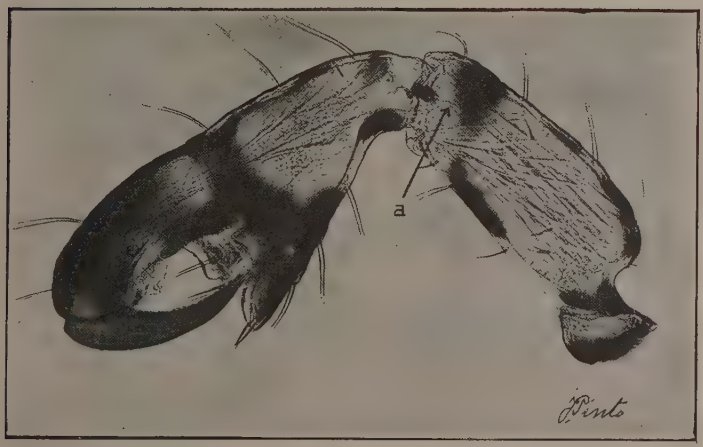


Fig. 2

Figs. 1 e 2—Pernas de *Haematopinus*. Nos pontos marcados vê-se o tendão do feixe femural do flexor da garra ($\times$ 80).

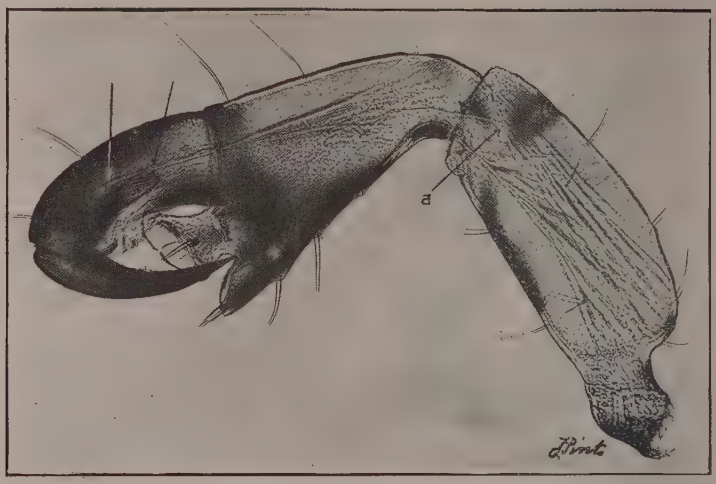


Fig. 3

Fig. 4

Figs. 3 e 4—Pernas de *Haematopinus*. Nos pontos marcados no tarso vê-se o tendão do extensor da garra, sobre o orgão tarsal. Na fig. 3, em *a*, o tendão do feixe femural do flexor da garra. ($\times$ 80)

Fig. 5

Fig. 6

Figs. 5 e 6—Nestas photomicrographias nota-se, nos pontos marcados, o tendão do flexor do tarso. Na fig. 6 vê-se perfeitamente que elle se insere na base do apodema tarsal e não na base do disco protractil. (× 80 e × 150)

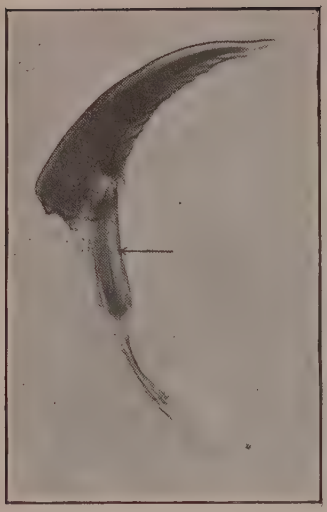


Fig. 7

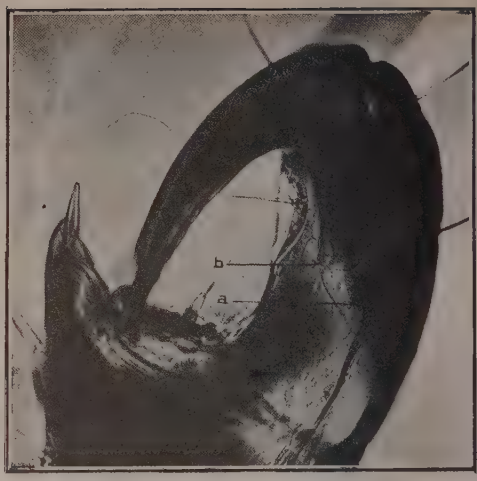


Fig. 9

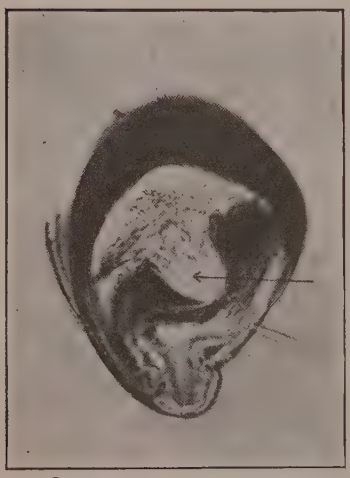


Fig. 8

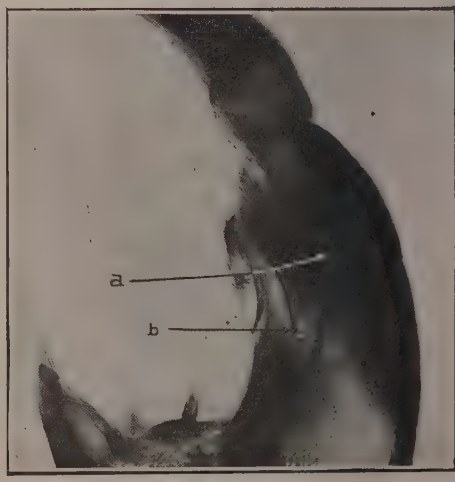


Fig. 10

Fig. 7—Garra de *Haematopinus*, com o orgão tarsal e o tendão do flexor da garra. (× 107)

Fig. 8—Corte feito ao nivel da extremidade do tarso, para se vêr a forma da gotteira tarsal, cujas paredes se mostram bem espassadas. Vêm-se tambem as partes molles do tecto, sem o orgão tarsal. (× 250)

Figs. 9 e 10—Tarsos de *Haematopinus* com a garra contrahida e distendida. Na fig. 9 a extremidade posterior do orgão tarsal (*a*) se acha aquem da extremidade posterior da gotteira (*b*) (× 170). Na fig. 10 aquella extremidade se acha alem desta. (× 163)

(Photomicrographias de J. Pinto).

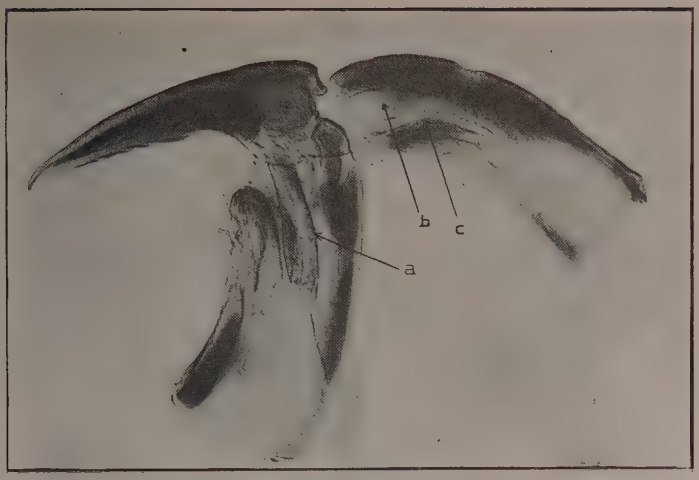


Fig. 11

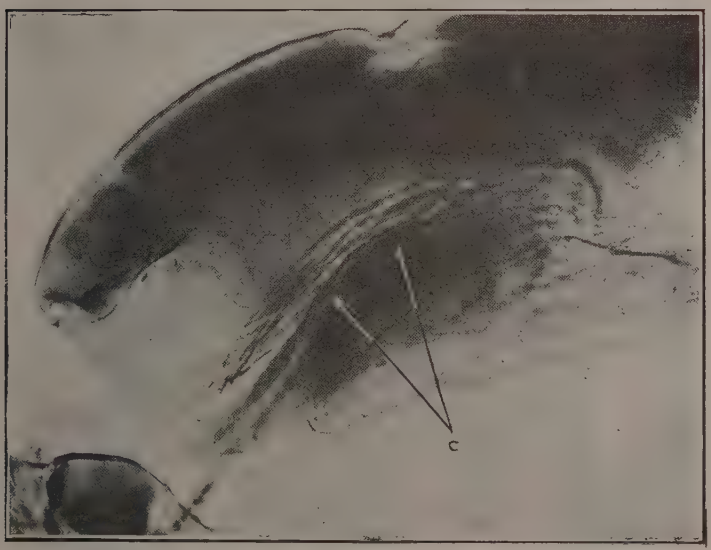


Fig. 12

Fig. 11—Tarso de *Haematopinus* fendido. N'uma das metades vê-se o orgão tarsal (*a*) em relação com uma parte da gotteira tarsal. Na outra metade vê-se apenas a cavidade tarsal (*b*) e a outra parte da gotteira tarsal (*c*) ($\times$108).

Fig. 12—Ampliação da metade tarsal superior da fig. 11, para se ver o aspecto da superficie da gotteira tarsal, eriçada de pequeninos dentes em *c*. ($\times$ 383). (Photomicrographias de J. Pinto).

O cyclo estral dos ratos em parabiose, e os hormonios do lobo anterior da hypophyse

Pelo Dr. THALES MARTINS

Laboratorio de Physiologia, Instituto Oswaldo Cruz

Publicámos no ultimo numero deste supplemento (1) os primeiros resultados por nós observados na parabiose do rato branco, relativamente ao intercambio hormonal.

Foi demonstrada a passagem do hormonio ovariano de uma femea normal para uma castrada; resultado identico foi conseguido quando um dos animaes soffria a ablação do utero. No presente trabalho, continuamos a observação dos animaes, iniciada na nossa nota anterior.

Outros autores que pesquizaram o cyclo sexual dos ratos naquella situação experimental, chegaram a conclusões diversas, antes de nós.

ZACHERL (2), na parabiose de uma femea normal com uma castrada, verificou que 8 a 10 dias após a operação, as variações cyclicas do estro desappareciam, e o frottis vaginal mostrava sempre leucocytos e cellulas epitheliaes. Um estadio de cellulas keratinisadas puras nunca foi encontrado; na parceira castrada, observou a mesma cousa.

FELS (3) verificou que a normal ás vezes se apresenta com estros duradouros, mas a castrada fica permanentemente em intervallo.

Em conclusão: ZACHERL e FELS não verificaram a passagem do hormonio ovariano da rata normal para a castrada.

A causa da diversidade dos resultados dos autores citados e os nossos não resalta claramente, dada a falta de detalhes nas publicações referidas. Insufficiencia de relações vasculares? Possivelmente o estado geral dos animaes teria influencia, uma vez que FELS conseguiu em media, uma sobrevida de 3 semanas após a operação, e um maximo de 38 dias.

Temos animaes muito bem dispostos, com 70 dias de parabiose, e o par R 3 (fig. 1) foi photographado no seu 46º dia.

EXPERIENCIAS

6 ratos brancos femeas da mesma ninhada foram tomados para a experiencia. Quando attingiam um peso de 35–37 grs, 3 foram castrados. 25 dias após, com um peso de 75—80 grs, foram feitas as parabioses, (coelioanastomose), abertas largamente as cavidades abdominaes, fazia-se a sutura em tres planos: peritoneo, musculo e pelle.

Os animaes ficaram assim distribuidos:

Par R 2—Uma hysterectonisada com uma castrada.
Par R 3—Uma normal com uma castrada.
Controles livres—Uma normal e uma castrada.

O frottis vaginal era pesquizado diariamente com a technica usual; quando havia duvidas sobre a modificação delle, repetia-se 2 a 3 vezes por dia. No quadro figura o que houve de mais caracteristico.

No par R 2, foi retirado o utero totalmente, da rata não castrada, para diminuir a massa de tecidos fixadores do hormonio ovariano, o que seria talvez um impecilho para a passagem desse á companheira castrada. A experiencia demonstrou, entretanto, que tal operação não era necessaria, e os resultados são nitidos (v. quadro).

No par R 2, já no 3º dia após a parabiose, a hysterectomisada estava em estro; mas um estro de intensidade supra normal, a julgar pela massa de cellulas keratinisadas, que enchiam totalmente a vagina como uma rolha, estadio representado no quadro: +++++. Tal aspecto nunca foi por nós observado em animaes normaes isolados. Esse estro durou 6 dias, quando normalmente elle dura, em media, de 1 a 2 dias.

Terminado esse primeiro estro, a parceira castrada apresentou-se tambem em estro, que durou 2 dias, sendo que no 1º elle tinha o aspecto acima descripto, de enorme abundancia de cellulas keratinisadas.

Seguiu-se a isso um periodo de diestro; no 17º dia, a hysterec. estava em proestro; 48 horas após, a mesma cousa for observada na castrada.

Do 22º ao 29º dia, nova phase de estro prolongado, durando cerca de 8 dias, nos dois animaes.

Do 34º ao 42º, um terceiro cyclo prolongado; mas nesse, ha a notar uma modificação do quadro, que se torna irregular na não castrada. Enquanto que na castrada o estadio de keratinisação pura é verificado durante pelo menos 8 dias, a não castrada apresentava sempre cellulas nucleadas ou leucocytos, de mistura com as keratinisadas.

No par R 3 (normal mais castrada) os resultados são perfeitamente identicos, e, em suas linhas geraes, concordam plenamente com o descripto em R 2; basta acompanhar o quadro para verificar isso. Tambem ahi, na terceira grande serie de estro, na castrada foi possivel encontrar o estadio de pura keratinisação, ao passo que na normal leucocytos ou cellulas nucleadas estavam sempre presentes.

Os animaes sempre se mantiveram em optimas condições geraes e harmonicamente, isto é, sem que um delles fosse anemico ou plethorico.

No 38º dia, o par R 3 foi submettido á laparotomia, retirando-se então os ovarios e pontas uterinas dos 2 animaes; em seguida fechou-se de novo a cavidade abdominal, e os ratos conservados vivos.

Nessa occasião, observou-se que a união dos tecidos era perfeita; vasos perfeitamente visiveis a olho nú iam de um animal para outro, estabelecendo uma communicação vascular ampla. Na mesma occasião fez-se operação identica no controle normal.

Nos dias subsequentes, observou-se, em relação ao cyclo estral, o seguinte: *Par R 3* – dois dias de estro na castrada; um dia de cellulas nucleadas puras, na parceira anteriormente normal. *Controle*—Um cyclo estral normal. Em seguida, repouso sexual em todas.

Os orgãos retirados (figura 2) mostram o grande augmento dos ovarios da parabiosada, e tambem do utero, em relação ao controle normal, congestos; o utero da castrada, si não tem um desenvolvimente comparavel ao controle, está entretanto longe do aspecto atrophico e anemico que

se observa após a castração. A morte do controle castrado impede uma comparação; todavia, como o rato é hoje um animal standardisado para esta sorte de pesquizas, qualquer especialista verificará ao examinar a figura, que tal orgão soffreu evidentemente a influencia do hormonio ovariano da companheira.

Microscopicamente, os ovarios de R 2 demonstram uma luteinisação abundante, e os poucos folliculas encontrados apresentam-se muito dilatados, como cystos em inicio.

O estudo detalhado da histologia da genitalia dos parabiosados constituirá assumpto para publicação posterior.

DISCUSSÃO

Acreditamos que as experiencias citadas demonstram seguramente a circulação do hormonio no animal castrado, quando unido em parabiose com um não castrado.

Alem daquellas, outras repetidas em camondongos confirmam os resultados.

Os ovarios do animal em parabiose trabalham portanto em excesso, havendo hormonio em quantidade sufficiente para a provocação de um estro prologado nos dois animaes. Isso é devido á acção dos hormonios do lobo anterior da hypophyse, que passam do castrado para o normal.

Em nosso artigo anterior, já discutimos o assumpto, lembrando que MATSUYAMA (4) foi o primeiro a descrever as alterações da genitalia das ratas normaes, quando unidas a castradas. O que no momento não tinha explicação razoavel, hoje, se interpreta pela acção dos hormonios prehypophysiarios. KALLAS (5), especialmente, provocando a puberdade precoce em ratos infantis normaes, ligados a infantis castrados, tornou evidente a acção caracteristica do lobo anterior da hypophyse.

Ha portanto, em circulação no animal castrado, hormonios do lobo anterior (H. KALLAS, FELS, TH. MARTINS).

Na parabiose com colioanastomose, as trocas humoraes se fazem muito precocemente; não é de extranhar portanto, que já no 3º ou 4º dia o hormonio prehypophysario vá influir sobre os ovarios da normal.

Analysando mais aprofundadamente a questão, varias interpretações poderiam ser suggeridas. Uma se apresentaria logo, e impunha-se eliminal-a. Como é sabido, ZONDEK e ASCHHEIM (6) demonstraram a grande producção de hormonio hypophysiario durante a gravidez, na mulher e no chimpanzé.

Na parabiose de um animal castrado com um normal, temos uma situação muito semelhante á gravidez em inicio, que até certo ponto é uma parabiose de um organismo sexuado com um neutro.

Apezar de não se ter ainda demonstrado tal superproducção hormonal nos roedores, durante a prenhez, era necessario verificar si na parabiose o hormonio provem do castrado, ou si ao contrario é secretado em excesso pelo normal. Com a injecção de sangue de ratos infantis castrados em infantis normaes, demonstramos anteriormente (1) que se pode provocar a puberdade precoce.

O hormonio, portanto, circula livremente no castrado.

Poder-se-ia admittir um accumulo da secreção normal, na ausencia dos orgãos fixadores do hormonio, como acredita FELS. Em nosso trabalho anterior, apresentamos a interpretação de que existe uma interrelação reciproca, entre gonadas e hypophyse. Com a castração, no animal infantil, ha uma actividade prematura da hypophyse; e no animal adulto, uma hyperfuncção.

Num trabalho de LIPSCHÜTZ (7) sobre a folliculina, que chegou ás nossas mãos ha dias, é dito de passagem que experiencias de KALLAS, no laboratorio daquelle eminente professor, "revelaron con gran probabilidad el hecho importantisimo que ya antes de la pubertad el ovario influye sobre el lobulo anterior de la hipofisis".

A nossa interpretação se approxima portanto, da de KALLAS, a julgar pelo curto trecho citado.

As experiencias que temos tentado, e que viriam decidir a questão de accumulo ou hyperfuncção, tem encontrado grandes difficuldades quanto á resistencia dos animaes. Nós nos propuzemos a fazer a parabiose de castrados com normaes, tirando a hypophyse de um ou de ambos; mas a ablação desse orgão já por si é das menos supportadas; combinada á parabiose, difficilmente é compativel com a vida. Os nossos operados (cães) não tem resistido, mas continuamos as tentativas.

* * *

Voltando á questão do estro nos dois pares de parabiose descriptas neste trabalho, poremos em evidencia alguns pontos interessantes.

O que impressiona, na observação de 46 dias, é a perfeita coincidencia dos resultados. Tomando em consideração as não castradas dos pares R 2 e R 3, verifica-se que houve, de inicio, um estro prolongado; depois, um espaço de 14 dias, um cyclo curto, que não chegou a estro completo. Em seguida, nova phase de estro alongado; depois disso, um lapso de quadros irregulares, em que leucocytos e cellulas nucleadas estão sempre presentes; mas, tanto em R 2 como em R 3, a castrada demonstrava nessa occasião estro completo. Depois de retiradas as partes uterinas e os ovarios do par R 3, ainda houve dois dias de estro na castrada, e um de cellulas nucleadas puras na parceira, o que significa acção do hormonio ovariano ainda restante na circulação ou já fixado pelos effectuadores. Da mesma maneira, no controle normal, a castração feita no segundo dia de diestro, não impediu o cyclo seguinte.

ZONDEK e ASCHHEIM referem a impossibilidade de obter estro duradouro, pela administração chronica de hormonio hypophysario; no decurso de 14 dias, elle se apresenta uma ou duas vezes. Examinando o quadro, verifica-se que realmente, o resultado corresponde á descripção de ZONDEK e ASCHHEIM, nos primeiros 17 dias. Dahi em diante, elle se caracteriza por mais dois periodos estraes longos. Tem-se a impressão de de um periodismo, que poderá ser devido á hypophyse, ou aos ovarios.

Quanto á irregularidade dos elementos do frottis vaginal encontrada nas não castradas R 2 e R 3 no 3º longo periodo, não temos ainda explicação satisfactoria. Cyclos estraes curtos, dos quaes não foi possivel surprehender o estado de keratinisação pura? A keratinisação mantida pelas

castradas, nesse periodo, torna obscura a interpretação. Existencia de um factor na normal, que não influia sobre o estro da castrada?

Talvez a irritação devida á retirada do material para frottis, durante praso tão longo, provoque alterações da mucosa; mas nesse caso, o mesmo facto deveria ser observado nas castradas ou no controle normal livre.

E' uma questão a elucidar. (*)

BIBLIOGRAPHIA

Ver no final da traducção ingleza.

(*) Nota durante a impressão — Recebemos, enviado amavelmente pelo Prof. LIPSCHÜTZ, separatum de uma conferencia de H. KALLAS, em Concepcion, Chile (Bol. de la Soc. de Biol. de Concepcion, 3, 3, 4—1929). Neste trabalho se allude á possivel exacerbação do lobo anterior, após a castração; desse modo, o nosso ponto de vista concorda com o de KALLAS, vendo nos resultados das experiencias de parabiose uma demonstração da reciprocidade de correlações entre gonadas e hypophyse.

The estrous cycle of the albino rat in parabiosis, and the hormons of the anterior hypophysis

By THALES MARTINS, M. D.

From the Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute.

In the last issue of this Supplemento (1), we published our first observations on the parabiosis of the Albino Rat, as regards hormoneal interchange.

We demonstrated the passage of ovarian hormons from a normal to a spayed female. The same result was obtained, when the non castrated fellow was hysterectomized.

In this paper, a more extensive observation of the estrous cycle is described.

We have read publications of other authors, who investigated about te sex cycle of rats in parabiosis, with different results.

ZACHERL (2) in the parabiosis of a normal female with a castrated one, observed that, eight to ten days after the operation, the cyclic variations of the estrus disappeared and the vaginal smearing showed always leucocytes and epithelial cells. A stage of pure keratinized cells was never found; in the castrated fellow, the case was the same.

FELS (3) verified that the normal fellow would at times appear with prolongated estrus, but the castrated was continually in diestrus. To conclude, ZACHERL and FELS did not verify the passage of ovarian hormon from the normal rat to the castrated.

It is difficult to ascertain the exact cause for the difference of results in the quoted experiments and our own, because the papers are very summarized. Perhaps, insufficiency of vascular relations, or unsatisfactory health condition of the animal.

FELS succeeded in getting survivance for about three weeks after the operation, with a maximum of 38 days.

We have animals in very suitable conditions, now with seventy days of parabiotic life; and the pair R 3 (fig. 1) was photographed on the 46th day.

EXPERIMENTS

Six female albino rats of the same litter were taken for this series. When they reached a weight of 35 to 37 grams three of them were castrated. Twenty five days later, when weighing 75 to 80 grams, the parabiosis were performed by coelioanastomosis, the abdominal cavities widely opened; the sutures were effected in three stages: peritoneum, muscle and skin.

The animals were distributed as follows:

Pair R 2—One hysterectomized with one castrated;
Pair R 3—One normal with one castrated;
Solitary controls—One normal and one castrated.

The vaginal smearing was tested daily with the usual technique; when any doubt could exist about possible alteration, it was repeated two or three times daily. In the table, we see the more characteristical findings. In the pair R 2, the uterus of the non castrated fellow was totally ablated, in order to diminish the mass of fixing tissues for ovarian hormon.

The experiment demonstrated, however, that such an operation was not necessary, and the results are conclusive (See Table).

In pair R 2, already on the third day after the parabiosis, the hysterectomized was in full estrus; but in a supra normal estrus, such as we never observed in normal animals. The vagina was overfilled with the keratinized cells mass, quite as plugged. This stage is shown in the table: +++++.

This first estrus lasted for six days, (when, normally its duration in our rats, is, as an average, 1 to two days) after which the castrated fellow showed a two days estrus; on the first day, with the above referred aspect with a huge plenty of keratinized cells. This was followed by a period of diestrus. On the seventeenth day, the hysterectomized was in pro-estrus; 48 hours later, the same was observed in the castrated.

From the twenty-second to the twenty-ninth day, new stage of prolonged estrus, with a duration of about eight days in both animals.

From the thirty-fourth to the forty-second, one third estrous period, in which, however, a modification of the smearing aspect must be emphasized.

Wilst in the castrated fellow, the stage of pure keratinization was to be observed for at least eight days, the non castrated always showed nucleated cells and leucocytes mixed with the keratinized.

In Pair R 3 (normal plus castrated), the results are similar. In general lines, they are plainly concordant with R 2. The mere comparizon of both tables is a proof thereof. In the third prolonged stage of estrus in the castrated, it was possible to detect the pure keratinization stage, but in the normal, leucocytes and nucleated cells were always present.

The animals were always kept in the best possible general conditions. The parabiosis was harmonical, that is to say, none of them was either anemic or plethoric.

On the thirty-eighth day, the pair R 3 was laparatomized; the ovaries and uterine cornua were ablated, the abdominal cavities were sutured and the animals kept alive.

By this opportunity, it was observed that the union of the tissues was perfect; blood vessels, plainly seen with the naked eye, in the abdominal wall, went from one to the other animal, thus establishing an ample vascular connection.

At the same time, an identical operation was effected with the normal control.

On the following days, it was observed, as regards estrus cycle, in pair R 3, two days of days of estrus in the castrated, one day of pure nucleated cells, in the previously normal follow.

Control.—A normal estrus cycle, followed by a period of rest.

The ablated organs (fig. 2) showed in the normal fellow an increase of the ovaries and uterus, richly vascularized. The uterus of the castrated fellow, if not so developed than the control's is however far from the atrophic and anemic appearance observed after castration. The death of the castrated solitary control prevented us from making a comparizon; nevertheless, being the rat nowadays a standardized animal for this kind of researches, any specialist may verify, on examining the figure, that this organ was probably influenced by the ovarian hormon from the normal fellow.

Microscopically, the ovaries of R 2, showed a full luteinization; the few follicles found were much distended, like incipient cysts.

Careful histologic study of the whole genitalia will be the object of an extensive description to be published later.

DISCUSSION

We believe the experiments we have reported, demonstrate with certainty a circulation of the ovarian hormon taking place in the castrated animal, when united in parabiosis with a non castrated.

Besides this, we have in course experiments in mice, confirming these results.

The ovaries of the animal in parabiosis secrete thus exaggeratedly; the hormon existing in quantity, sufficient to produce prolonged estrus in two animals. This must be ascribed to the action of the anterior hypophysis hormons, that pass from the castrated to the normal animal.

In our previous paper, we discussed this question, and remembered that MATSUYMA (4) was the first author, who described the changes of the genital organs, in a normal rat, when this was united with a castrated one. What till now remained without a satisfactory explanation is to-day interpreted as owing to the action of the prehypophyseal hormons.

More particularly, KALLAS (5) inducing precocious maturity in infantile normal rats, when parabiosed with infantile castrated, made patent the characteristical action of the hypophyseal anterior lobe.

These hormons circulate in the castrated animal (H. KALLAS, FELS, TH. MARTINS).

In the parabiosis with coelioanastomosis, the humoral interchanges are very precocious. No wonder then, if already on the third or fourth day, the pituitary hormons act upon the fellow.

By going more thoroughly into the question, various explanations could be suggested. One would appear at first and could be easily tested. It is known that ZONDEK and ASCHHEIM (6) have demonstrated the the enormous production of hypophyseal hormons during pregnancy in women and chimpanzee.

In the parabiosis of a castrated with a normal animal, we have an experimental condition, similar to beginning pregnancy, which, to a certain extent, is also a parabiosis of a female organism with a sexually neutral one.

Though we did not up to the present, succeed in demonstrating the elimination of hypophyseal hormones by pregnancy in rodents, it was necessary to ascertain, whether in parabiosis, the hormon is elaborated by the castrated fellow, or if, on the contrary, it is secreted in excess by the normal.

By injecting blood from infantile castrated in infantile normal rats, we demonstrated in a former work (1) that precocious maturity can be induced; this proves that the hormon circulates in the blood from spayed animals. One might admit that this means merely accumulation of the normal secretion in the absence of the receptor organs (ovaries) as FELS supposes.

Our interpretation, as we suggested, is that there exists a reciprocal interrelation between gonads and hypophysis.

After castration in infantile animals, there is precocious activity, and if the castration is effected in adult animals, an hyperfunction establishes itself.

In a paper of LIPSCHÜTZ (7) on Folliculin, which came to our hands a few days ago, it is stated occasionnally that KALLAS' experiments, at his laboratory, "revealed with a great probability, this most important fact that ovaries, already before puberty, exert an influence on the anterior lobe of the hypophysis". Our opinion is very near to KALLAS' as far as we may judge from the short passage quoted in that paper.

Decisive experiments should be the parabiosis of hypophysectomized (one or both) animals.

We have performed several attempts, however without success.

Hypophysectomy is a very severe operation, specially when in combination with parabiosis.

Our operated animals (dogs) did not survive for a time sufficient for observation, but we are proceeding further in our attemps.

* * *

Returning again to the question of estrus in both pairs of of parabiosis as described, there are some points which require to be emphasized. The most impressive fact is perhaps, after 46 days observation, the coincidence of results.

Taking in consideration the non castrated fellows (Pair R 2 an R 3), one may verify that there was, at the beginning, a prolonged estrus, after which, in a lapse of 14 days, a very short uncomplete cycle. Hereafter, a new stage of durable estrus; then, a series of irregular appearances, in which leucocytes and nucleated cells are always present. Nevertheless, as well in R 2 as in R 3, the castrated showed by this time a full estrus. After ablation of uterine cornua and ovaries from the pair R 3, there was still a two days' estrus in the castrated, and one of nucleated cells in the other fellow. This means an action of the ovarian hormons still existing in circulation, or already fixed by the effector organs. Likewise, in the normal free control, castration, performed on the second day of diestrus, did not prevent anyhow the following cycle.

* * *

ZONDEK and ASCHHEIM refer to the impossibility to induce durable estrus through chronic administration of hypophyseal hormons. In the course of 14 days, it appears once or twice. On examining the frame, one may verify that, as a matter of fact, the result is perfectly concordant with ZONDEK and ASCHHEIM's description, during the first 17 days; after this time, we observe two more prolonged periods of estrus. One gets the impression of a periodism, which may be ascribed to hypophysis or ovaries.

As regards the irregularity of the vaginal smearing constituents, which are found during the third long period, we are unable, up to the present, to give a satisfactory explanation of this fact. Should this mean short estral cycles, of which it has not been possible to detect the pure keratinization stage? The keratinization, maintained by the castrated leaves this interpretation obscure.

Does this imply the existence of a factor in the normal, which is of no influence on the estral condition in the castrated? May be, the irritation caused by the smearing test, during such a long time, determines alterations in the mucosa; but, in this case, the same ought to be observed in the castrated fellow or in the free normal control.

This is a question which only further study may solve (*).

BIBLIOGRAPHY

1—MARTINS, TH.—Instituto Oswaldo Cruz, Supplemento, nº. 10, pg. 233 and 242, 1929.
C. rend. Soc. Biol. (Soc. bres. de biologie, seance 28-8-929).
2—ZACHERL, H.—Klin. Woch., 6, 1614, 1927.
3—FELS—Med. Klin., 25, 557, 1929.
4—MATSUYAMA—Frankf. Zeits. f. Path., 25, 436, 1921.
5—KALLAS, H.—C. R. Soc. Biol., 100, 979, 1929.
6—ZONDEK and ASCHHEIM—Klin. Woch, 7, 831, 1928.
7—LIPSCHÜTZ, A.—Rev. Med. de Chile, 57, 503, 1929.

(*) NOTE.—In the course of printing, we received by kind attention of Prof. LIPSCHÜTZ, a separate paper from a lecture by H. KALLAS, in Concepción (Chile) (Bol. de la Soc. de Biol. de Concepción, 3, 3, 4—1929). In this paper, the author alludes to the possible exacerbation of the anterior lobe after castration; thus, our point of view would be in accord with KALLAS', when he sees, in the results of his parabiosis experiments, a demonstration of reciprocal a gonado-hypophyseal correlation.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

R 2

Days after parabiosis	Castrated				Hysterectomised				Castrated		
	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	*Keratinised cells*	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	*Keratinised cells*	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells
3											
4											
5											
6											
7											
8	No material										
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30	No examination										
31											
32											
33	No material										
34											
35											
36											
37											
38											
39											
40											
41											
42											
43											
44											
45											
46											

Fig. 1 Photo J. Pinto

Par R 3, no 46o dia de vida parabiotica.
Pair R 3, 46th. day of parabiotic life.

Fig. 2 Photo J. Pinto

1—Pontas uterinas da rata castrada (Par R 3).
2—Ovarios e pontas uterinas da rata normal (Par R 3).
3—Ovario e pontas uterinas do controle normal.

1—Uterine cornua (castrated R 3).
2—Ovaries and uterine cornua (normal R 3).
3—Ovaries and uterine cornua (solitary normal control).

Sobre alguns anophelineos encontrados no Brasil

(*2a. Nota*)

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA

Em artigo anteriormente publicado (1928), admitti, até certo ponto baseado na autoridade de CHRISTOPHERS, como generos perfeitamente validos da tribu Anophelini, os seguintes: *Anopheles*, *Bironella*, *Chagasia*, *Myzomyia*, *Nyssorhynchus* e talvez *Stethomyia*. Destes generos, o segundo e o quarto não nos interessam, pois não tem especies da região neotropica.

Tratando do genero *Nyssorhynchus* (*Cellia* auct.), distribui então as especies que o constituem em 2 subgeneros: *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. Por não ter podido ler naquella occasião a opinião definitiva de ROOT (1927) sobre o grupo *Myzorhynchella*, deixei de o considerar como mais um subgenero de *Nyssorhynchus*, o que ora faço, ficando assim este grupo, que considero generico, subdividido em 3 subgeneros: *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*.

No presente artigo tratarei dos anophelineos encontrados no Brasil que devem ser incluidos no genero *Anopheles* (MEIGEN, 1818) CHRISTOPHERS, 1915.

As especies do genero *Anopheles* existentes no Brasil, em rigor, difficilmente podem ser distribuidas, como as de *Nyssorhynchus*, em grupos distinctos. Todavia, para facilitar a sua determinação, não vejo inconveniente em se as separar em 2 grupos subgenericos: o primeiro—*Anopheles*—comprehendendo aquellas cujos segmentos abdominaes são desprovidos de tufos de escamas; o segundo — *Arribalzagia* — constituido pelas que apresentam taes tufos bem evidentes.

Passo em seguida a considerar especialmente as que pude examinar.

Subgenero **Anopheles**.

Anopheles (Anopheles) eiseni COQUILLET, 1902.

Esta especie, encontrada do Mexico até o E. do Rio, no Brasil, foi em 1906 redescripta por NEIVA com o nome de *Myzomyia tibiamaculata*. Mais tarde, porém, segundo se lê na monographia de HOWARD, DYAR & KNAB, aquelle autor teve o ensejo de verificar que a especie por elle descripta era identica a *A. eiseni* COQUILLET, identidade essa recentemente confirmada por F. M. ROOT (1927).

Trata-se de uma especie bem caracteristica pela faixa branca apical das tibias do par posterior.

Possue a collecção do Instituto 4 exemplares, 2 ♂♂ e 2 ♀♀ (vidros 367-370).

Examinando a terminalia (1) dos machos da nossa collecção (laminas

(1) Segundo FREEBORN (Amer. Journ. Hyg. 1924, p. 189) é preferivel, por ser mais correcto, usar a palavra *terminalia*, em vez de *genitalia*, para designar os appendices terminaes combinados do abdomen dos machos dos mosquitos.

882-883) pude tambem verificar a similitude perfeita dos caracteres que ella apresenta com os que são descriptos e figurados para a mesma estructura de *eiseni*.

Anopheles (Anopheles) peryassui DYAR & KNAB, 1908.

(= **Manguinhosia lutzi** CRUZ, 1907) (2).

Como ainda não foi descripta a terminalia desta especie, considero-a provisoriamente como pertencente ao subgenero *Anopheles*, por não ter tufos de escamas ao lado dos varios segmentos abdominaes. De facto, em parte ella se differencia dos verdadeiros *Anopheles*, não só pelo revestimento caracteristico de escamas dos ultimos segmentos abdominaes, que dão a essa parte do abdomen o aspecto de cinza de charuto, como tambem pelo aspecto das azas, relativamente bem differente do que se observa nos *Anopheles* typicos. Todavia, se por esses caracteres e pelas 3 manchas escuras do mesonoto, ella, até certo ponto, se aproxima das Arribalzagias, dellas, entretanto, se fasta pelo aspecto das pernas, caracteristicamente sarapintadas de escamas claras nessas especies e pela ausencia de tufos lateraes nos 6 primeiros segmentos abdominaes, sempre presentes nas verdadeiras Arribalzagias. Dahi *Manguinhosia* CRUZ ter sido considerado, ora no grupo *Anopheles*, por varios autores, ora no grupo *Arribalzagia*, como o fizeram CHRISTOPHERS e ROOT.

Indubitavelmente o estudo da terminalia e dos estadios do desenvolvimento metamorphico de *A. peryassui*, ainda não conhecidos, virão resolver a questão, de modo a se collocar definitivamente a especie num dos subgeneros mencionados ou talvez indicar a necessidade de se a manter em um grupo subgenerico distincto (*Manguinhosia*), que comprehenderia não sómente *peryassui*, como *Anopheles celidopus* DYAR & SHANNON, 1925, *Anopheles alagoani* PERYASSU, 1925 e *Anopheles muttogrossensis* LUTZ & NEIVA, 1911 (=*Anopheles* (*Anopheles*) *amazonicus* CHRISTOPHERS, 1923), especies que, a julgar pelas respectivas descrições, são extremamente proximas de *peryassui*.

Ultimamente recebi da Bahia, por intermedio do Dr. DAVIS, um exemplar considerado por SHANNON como *A. celidopus*. Comparei-o com a descripção de CRUZ da *Manguinhosia lutzi* e com 12 exemplares desta especie muito mal conservados (vidros 371-376), que encontrei na collecção do Instituto Oswaldo Cruz e que talvez representem o material typico usado por OSWALDO CRUZ, quando descreveu essa especie. Dessa comparação, resultou ficar convencido que aquella especie talvez seja uma variedade de *Manguinhosia lutzi* ou, como é hoje chamada, *Anopheles* (*Anopheles*) *peryassui*. A unica differença notavel que observei em *celidopus* é a que se refere ao revestimento de escamas amarelladas do 7º, 8º e 9º urotergitos, que em *peryassui* são de um branco puro.

---

(2) Tres anophelineos brasileiros receberam a denominação especifica—*lutzi*:

1º. *Nyssorhynchus* (*Myzorhynchella*) *lutzii* (CRUZ, 1901) (*Anopheles lutzii* CRUZ, 1901).

2º. *Nyssorhynchus* (*Kerteszia*) *cruzii* DYAR & KNAB, 1908 (=*Anopheles lutzii* THEOBALD, 1901).

3º. *Anopheles* (*Anopheles*) *peryassui* DYAR & KNAB, 1908 (=*Manguinhosia lutzi* CRUZ, 1907).

Nota-se tambem nas azas uma pequena differença no aspecto das escamas lateraes das nervuras, para o lado da base da aza. Em *peryassui*, taes escamas, com as da serie mediana de cada nervura, porém maiores que estas, são mais ou menos truncadas. Em *celidopus* aquellas escamas na base da aza são obovoides estreitas e, em geral, não truncadas. Essa differença, aliás pouco notavel, parece ser constante, á julgar pela comparação que fiz dos nossos 12 exemplares de *A. peryassui*, com o exemplar de *celidopus* que recebi da Bahia (vidro 377) e com um outro especimen que encontrei na collecção do Instituto, com a indicação "Xerem", colhido por NEIVA. Este ultimo exemplar (vidro 379) é muito interessante, pois, não obstante se achar mal conservado, como os de *peryassui* procedentes de Minas, muito se parece com o especimen de *celidopus* da Bahia, não só pelo aspecto das azas, como se pode ver comparando as figuras 1—3 (Est. II), 15—16 (Est. V), 17 (Est. VI) e 19—20 (Est. VII), como pelo revestimento dos ultimos segmentos abdominaes.

O exame do especimen de *celidopus* colhido por DAVIS & SHANNON na Bahia fez-me tambem suspeitar que essa forma e *alagoani* PERYASSU sejam identicas. Como, porém, ainda não pude examinar o material typico de *alagoani*, que não encontrei neste Instituto, não posso, com segurança, considerar *alagoani* synonymo de *celidopus*.

Subgenero **Arribalzagia**.

A especie typo deste sub-genero é a que THEOBALD descreveu em 1903 com o nome *Arribalzagia maculipes*.

Quem estuda as especies de *Arribalzagia* encontradas na America do Sul immediatamente nota a discordancia na opinião de alguns autores relativamente a consideração das mesmas como especies perfeitamente estabelecidas.

BRÈTHES (1916) disse ter encontrado, na provincia de Buenos Aires, um exemplar macho de uma *Arribalzagia*, que descreve, considerando-a identica a especie descripta por F. LYNCH ARRIBALZAGA em 1878 com o nome de *Anopheles annulipalpis*. As considerações que esse autor fez á respeito e sobretudo a figura da terminalia que apresentou, mostram que o exemplar por elle examinado era, de facto, uma *Arribalzagia*—e elle assim o considerou—julgando-o identico a *Arribalzagia maculipes* THEOBALD. Como, porém, tambem o identificou com a especie anteriormente descripta por ARRIBALZAGA, concluio que o nome *Arribalzagia maculipes* THEOBALD devia ser incluido na synonymia de *annulipalpis*.

Ora, NEIVA (1915) já havia apresentado uma redescripção minuciosa de *Anopheles annulipalpis*, baseada no exame de 4 exemplares femeas, um dos quaes encontrado perto da localidade argentina em que fora apanhado o exemplar typico de ARRIBALZAGA. Indubitavelmente quem comparar a descripção deste ultimo autor com a redescripção de NEIVA, adquirirá a convicção de que ambas se referem a uma mesma especie. Aliás, SHANNON & DEL PONTE (1927), reexaminando alguns dos especimens estudados por NEIVA e observando novos exemplares tambem apanhados na provincia de Buenos Aires, que tambem descreveram, concluiram pela correcção da verificação feita por NEIVA.

A identico resultado tambem cheguei, depois de ter examinado um dos exemplares (n. 189) referido por NEIVA em seu trabalho e colhido

por C. BRUCH em Rio Santiago (Prov. de Buenos Aires), que se acha actualmente no vidro n. 365 da collecção entomologica deste Instituto.

Pode-se, pois, affirmar que *Anopheles (Anopheles) annulipalpis* é uma boa especie e considerar os 4 exemplares estudados por NEIVA como neotypos dessa especie, desde que se tenham perdido os cotypos de ARRIBALZAGA. Daquelles exemplares, 3 se acham na collecção do Instituto Bacteriologico de Buenos Aires e um na nossa collecção.

Quanto a *Arribalzagia annulipalpis* BRÈTHES, 1916 (nec F. LYNCH ARRIBALZAGA, 1878), sem se examinar o material estudado por BRÈTHES, não se podia sobre ella fazer um julgamento definitivo. Vi logo, porém, que não podia ser identica a *maculipes*, cuja genitalia conheço e da qual apresento os principaes detalhes na figura 3 (Est XVII). Como declarou o proprio BRÈTHES e como se pode verificar examinando a figura que elle apresentou da genitalia do especimen por elle estudado, este devia realmente ter grande affinidade com *Anopheles apicimacula*.

Por intermedio do meu distincto collega Dr. OLYMPIO DA FONSECA FILHO, que esteve ha pouco tempo na Republica Argentina, consegui examinar a preparação de BRÈTHES da genitalia de sua *Arribalzaga annulipalpis*. Os detalhes mais interessantes da mesma, que podem ser apreciados na figura 1 (Est. XVII), indicam claramente que se trata de *A. punctimacula*.

Ao colligir material de anophelineos do grupo *Arribalzagia* em Estrella (E. do Rio), nos primeiros mezes deste anno, tive o ensejo de verificar que lá, como já observara BOYD (1926), em outras partes da baixada fluminense, a especie que sempre apparece em maior abundancia é o *Anopheles* (*Arribalzagia*) *intermedius* CHAGAS. Em menor quantidade são capturados, não só na luz, como sobre cavallo, exemplares da especie até agora considerada com o nome—*A. pseudomaculipes* CHAGAS.

Alem destas duas especies tive o ensejo de apanhar, na luz, 2 exemplares femeas de uma pequena *Arribalzagia*, evidentemente differente d'aquellas especies. Examinando-os verifiquei que, embora apresentassem caracteres geraes de *pseudomaculipes*, não podiam, todavia, ser identificados com esta especie, por outros caracteres que lhes eram peculiares.

A principio pensei que se tratasse da especie descripta por THEOBALD sob o nome de *Arribalzagia maculipes*, porém vi logo, comparando-os com a descripção original desse autor, que tinha em mãos uma especie bem differente.

Entretanto, lendo a redescripção de *maculipes* feita por HOWARD, DYAR & KNAB, baseada em dois exemplares, um de Trinidad e outro do Brasil, procedente deste Instituto, com certo desapontamento verifiquei que os caracteres dos meus especimens estavam mais ou menos de accordo com os que foram assignalados nessa redescripção, principalmente na parte referente ao aspecto dos tarsos do par posterior.

Suspeitando que os meus especimens fossem uma nova especie, talvez a mesma dos que foram estudados por aquelles pesquizadores, pedi ao Dr. SOPER a fineza de obter nos E. Unidos um exemplar pelo menos de *Anopheles maculipes* para as necessarias comparações. SOPER escreveu nesse sentido não só ao Dr. RUSSEL, como aos Drs. DAVIS e SHANNON,

que se achavam na Bahia. Alguns mezes depois SOPER entregou-me a copia de uma carta do Dr. RUSSELL, datada de 20 de maio, na qual se lê a transcripção de uma resposta de M. ROOT, a proposito do meu pedido, transmittido por SOPER a RUSSELL.

Diz ROOT ter enviado a EDWARDS, do British Museum, exemplares do mosquito que até então era classificado como *pseudomaculipes* CHAGAS e que EDWARDS, depois de os ter comparado com o typo de *Arribalzagia maculipes* THEOBALD, verificou a identidade das 2 especies. Diz tambem ROOT que se deve dar um nome novo para a especie descripta por HOWARD, DYAR & KNAB sob o nome *A. maculipes* THEOB., por ser differente do verdadeiro *A. maculipes* THEOB. Aliás, foi por ter notado flagrante discordancia entre a descripção daquelles autores e a de THEOBALD para essa especie e suspeitado a possibilidade de uma differença entre os exemplares typicos e os que nos E. Unidos eram considerados como de *maculipes*, que fui levado a solicitar do Dr. SOPER obtivesse nesse paiz um exemplar de *A. maculipes* para os meus estudos. O resultado foi a resposta de ROOT, já conhecida.

Se bem que tentado a acreditar que os exemplares de *Anopheles maculipes*, HOWARD, DYAR & KNAB, 1917, (nec. *maculipes* THEOB., 1903, segundo ROOT), sejam da mesma especie dos meus, não posso, sem os ter examinado, concluir por essa identidade. A proposito devo ponderar que DYAR (1918), ácerca do especimen de Trinidad, do qual elle, HOWARD & KNAB se serviram para descrever o seu *Anopheles maculipes*, disse o seguinte: "The specimen from Trinidad, recorded in the Monograph (pag. 992, Chaquanas, Trinidad, March, 1914, I. F. Lasalle) is not *maculipes*, but the variety of *apicimacula* without the central black spot on the third vein of the wing".

Apenas o que posso dizer é que os dois exemplares de Estrella da nossa collecção são praticamente identicos a especie descripta por HOWARD, DYAR & KNAB e que tambem são bem differentes da especie até agora chamada *pseudomaculipes* e que é, segundos EDWARDS, o verdadeiro *maculipes* THEOB. E como taes especimens não me parecem identicos a *A. apicimacula*, considerei-os cotypos de uma nova especie—*minor* – cuja descripção foi lida na sessão de 31 de Julho da Sociedade Brasileira de Biologia e publicada no *Brasil Medico* de 14 de setembro deste anno (vol. XLIII, N. 37).

A 12 de setembro recebi da Bahia uma carta do Dr. DAVIS, datada de 2 desse mez, na qual elle se refere ao pedido que SOPER lhe fizera mezes antes de exemplares de *A. maculipes*, communicando-me tambem terem encontrado, elle e SHANNON, perto de S. Salvador, uma pequena especie de *Arribalzagia* muito semelhante a *maculipes* DYAR & KNAB. Declarava ainda DAVIS que SHANNON estava estudando o material afim de descrevel-a. Na mesma carta dizia que esperava enviar-me alguns exemplares para que eu manifestasse a minha opinião sobre a alludida especie.

No dia immediato (13) recebi os especimens promettidos (2 machos e 2 femeas), que, por me terem sido offertados, foram guardados nos vidros 381 a 384 da collecção do Instituto.

Comparando as femeas com os cotypos de *A. minor*, verifiquei a

identidade das mesmas com esta especie. Esse resultado foi communicado a DAVIS em carta que lhe dirigi após ter recebido aquelle material.

Considerando as Arribalzagias já referidas e as que ainda terei de tratar nesta nota, incluo neste subgenero as seguintes especies observadas na America do Sul.

mediopunctatus THEOBALD, 1903 (=*rockefelleri* PERYASSÚ, 1923).
maculipes THEOBALD, 1903 (=*pseudomaculipes* CHAGAS, 1908).
apicimacula DYAR & KNAB, 1906.
punctimacula DYAR & KNAB, 1906 (=*strigimacula* DYAR & KNAB, 1906; *malefactor* DYAR & KNAB, 1907; *annulipalpis*, BRÈTHES, 1917, nec F. L. ARRIBALZAGA; *venezuelae* EVANS, 1922).
intermedius CHAGAS, 1908.
fluminensis ROOT, 1927.
minor LIMA, 1929.
(? = *maculipes*, HOWARD, DYAR & KNAB, 1917).

Anopheles (Arribalzagia) mediopunctatus (LUTZ, in THEOBALD, 1903).

Como se sabe, esta especie foi descripta por THEOBALD de um exemplar macho que lhe foi enviado por LUTZ, evidentemente já por este reconhecido como uma nova especie, pois THEOBALD, ao designal-a na sua descripção, escreve: *Cyclolepteron mediopunctatus*, n. s. (LUTZ—M. S.). Resaltando, pois, do trabalho de THEOBALD, que foi LUTZ o responsavel pelo nome da especie, pela sua indicação, definição ou descripção, de accordo com o art. 21 das regras geraes de nomenclatura zoologica, incontestavelmente é este o ultimo o autor dessa especie.

Os referidos pesquizadores incluiram-na no genero *Cyclolepteron* por apresentar escamas em balão, aliás o caracter principal do genero, semelhantes as observadas em *A. grabhami* THEOB., especie typo do genero.

Pesquizas ulteriormente feites por M. ROOT (1922 e 1923) vieram demonstrar que nem os caracteres da terminalia, nem os larvaes autorizam a considerar *grabhami* n'um grupo distincto dos *Anopheles* typicos. Assim o grupo *Cyclolepteron* cahio naturalmente na synonymia de *Anopheles*, tanto mais quanto se verificou que a caracterisação dos grupos neste genero pelo aspecto das escamas da aza não pode hoje mais prevalecer. E como já tinham sido observadas grandes affinidades entre *mediopunctatus* e as especies do grupo *Arribalzagia*, os especialistas, em sua maioria, classificam-na como uma *Arribalzagia*.

Entretanto a terminalia do macho, como observaram BONNE (1923) e SOUZA PINTO (1925), e até mesmo os ovos, segundo BONNE (1923), apresentam caracteres tão singulares, que permittiriam separal-a completamente das demais Arribalzagias.

Como ficou dito anteriormente, as largas escamas obovoides (em balão) das azas são tão caracteristicas que, á primeira vista, parece facil, pela forma das escamas, distinguir-se *mediopunctatus* de qualquer outra *Arribalzagia*. Entretanto, se isso é verdade quando se compara este anophelineo com *maculipes*, a differença que se nota nas escamas já não é tão notavel quando foram examinadas separadamente azas de *mediopunctatus* e

de *fluminensis*, especie recentemente descripta por ROOT e que apresenta tambem grandes escamas obovoides, quasi tão largas como as de *mediopunctatus*.

E' nestes casos duvidosos que não se deve deixar de lado o estudo de outros caracteres especificos, para que se não incida no erro de determinar, como *mediopunctatus*, um anophelineo que não apresente escamas cor de ouro sobrepostas ás escamas negras dos tufos lateraes do abdomen. A presença de taes escamas num anophelineo deste grupo, perfeitamente visiveis nos angulos postero-lateraes dos tergitos abdominaes (do 2º ao 8º), basta para caracterisar este bello mosquito.

Quando estive em Estrella nos primeiros mezes deste anno, não logrei apanhar um só exemplar desta especie, mais tarde, porem, examinando anophelineos colhidos em Julho nessa localidade pelo Dr. OSWALDO CRUZ FILHO, encontrei um exemplar (♀), que se acha actualmente no vidro n. 390 da nossa collecção.

Anopheles (Arribalzagia) intermedius (CHAGAS, in PERYASSÚ, 1908).

Como se sabe, é esta uma das Arribalzagias que mais frequentemente se encontra na Baixada Fluminense.

Em fevereiro deste anno, epoca em que fiz em Estrella varias contagens de anophelineos apanhados a noite, na luz e sobre cavallo, notei, quasi sempre, a dominancia desta especie sobre as demais Arribalzagias. Só a superava, em numero de individuos apanhados nessas condições, o *Nyssorhynchus tarsimaculatus*. Entretanto, dentro das habitações, encontrávamos quasi que exclusivamente o *N. albitarsis*, ás vezes acompanhado do *N. tarsimaculatus*. O exame de uma boa serie de exemplares de *intermedius*, apanhados em Estrella e de alguns especimens collecionados por TRAVASSOS em Angra dos Reis, demonstra que esta especie pode apresentar variações notaveis, principalmente nas manchas das azas, na largura e disposição das grandes escamas brancas e pretas e nas manchas das pernas.

Eu não conheço bem nem *apicimacula*, nem *punctimacula*, porem, a julgar pelas descripções dos autores que as estudaram, ás vezes mesmo sob outros nomes, acho muito difficil dizer-se qual seja a differença notavel e constante pela qual se as considera distinctas. Parece-me tambem muito difficil apresentar uma caracteristica differencial nitida entre *punctimacula* e *intermedius*, ou mesmo *fluminensis*.

Dos caracteres differenciaes apresentados pelos autores, os melhores são os tirados da disposição das escamas das azas e sobretudo da largura das grandes escamas basaes e os da terminalia. Ora, quem se der ao trabalho de medir taes escamas em *intermedius*, verá como podem variar, apresentando-se em alguns especimens exactamente identicas as de *punctimacula*. Digo isto baseado no estudo comparado que fiz de azas de *intermedius* com uma preparação da aza de *malefactor* (n. 887), feita pelo Dr. CEZAR PINTO, de um exemplar remettido dos E. Unidos por KNAB. Aliás, a se adoptar o criterio da largura das grandes escamas para differenciação destas especies, *strigimacula* deveria ser uma especie distincta de *punctimacula* typica, pois apresenta as grandes escamas da aza mais estrei-

tas que em *punctimacula*, isto é, do typo observado em *apicimacula*, e, no entanto, *strigimacula*, como *malefactor* e *venezuelae*, são hoje considerados synonymos de *punctimacula*. A proposito desta ultima especie devo lembrar que entre DYAR e KNAB, os autores que a descreveram em 1906, surgio ulteriormente uma divergencia. O ultimo, ao tratar de *apicimacula* na grande monographia (1917), incluio *punctimacula* na synonymia dessa especie, dizendo:

"We have sunk *A. punctimacula* as a synonym of *apicimacula*, further study having convinced us that the differences on which the species was based, the less concrete black apical wing spot and the wholly white last joint of the hind tarsi, are not specific".

DYAR (1918), entretanto, retrucou o seguinte:

"In the monograph Mr. KNAB, at the last moment, placed *punctimacula* with *apicimacula* on his own responsability. I agree with him in the reduction by one of the number of species, but I think that the single type of *punctimacula* is clearly a *malefactor* and not *apicimacula*".

Ainda na sua ultima obra DYAR (1928) considera *apicimacula* e *punctimacula* especies distinctas. Assim tambem as considera ROOT, a meu ver actualmente uma das maiores autoridades em anophelineos das Americas.

De modo que, tendo em vista as grandes escamas das azas, não se pode deixar de admittir dois typos differentes de *punctimacula*: num (*strigimacula*) em que essas escamas são relativamente estreitas, como em *apicimacula*, noutro (*malefactor* ou *venezuelae*) em que as mesmas escamas são mais alargadas, como em *intermedius*. Dahi se poder suppor que esta ultima especie seja tambem uma forma de *punctimacula*. Entretanto, os caracteres da terminalia, especialmente o aspecto do mesosoma, em *intermedius*, parecem dar-lhe uma posição systematica no grupo das Arribalzagias quasi tão singular como a de *mediopunctatus*.

De facto, o aspecto dos foliolos do mesosoma, como mostrou ROOT (1924) e como tambem se pode ver no desenho que apresento (Est. XVII, fig. 2), é absolutamente typico.

A figura apresentada por SOUZA PINTO (1925) para a genitalia de *A. maculipes* THEOB., seguramente não corresponde ao que se vê nesta especie e sim uma representação fiel do que se encontra em *A. intermedius*.

Não obstante ROOT, em suas figuras, não indicar os augmentos respectivos, parece que todas as que se acham em cada estampa tenham sido desenhadas com igual ampliação, e, nestas condições, pode-se ver que é realmente notavel a differença entre *intermedius* e *punctimacula*. E' bem verdade que, na mesma estampa em que isso se nota, se verifica tambem a semelhança dos mesosomas de *apicimacula* e *punctimacula* e a differença relativamente consideravel desse orgão nas formas *punctimacula* e *strigimacula*, hoje consideradas uma só especie.

Fiz, entretanto, uma observação pela qual se verifica haver de facto uma grande differença para o lado dos foliolos do mesosoma em *intermedius*. Comparando-os com os orgãos lateraes (claspettes), constituidos pela fusão das peças da pincetta, notei, em varias preparações da terminalia de *intermedius*, que essa peça é bem maior que o maior foliolo apical do

mesosoma, ao passo que nos desenhos de ROOT (1923), não só em *apicimacula*, como em *punctimacula*, nas suas duas formas (*malefactor* e *strigimacula*), os grandes foliolos apicaes ou são iguaes ou maiores que a pincetta. Em todo o caso, não resta a menor duvida que *apicimacula*, *punctimacula*, *intermedius* e, como veremos, *fluminensis*, são formas extremamente proximas.

No que respeita ao estudo das phases de desenvolvimento, larvas e pupas, notam-se tambem semelhanças tão perfeitas entre *apicimacula* e *punctimacula* e entre esta especie e *intermedius*, que tornam taes especies praticamente indistinguiveis, quando nesses estados evolutivos. De facto, até ha bem pouco tempo, ninguem havia apresentado caracteres differenciaes entre *apicimacula* e *punctimacula*.

DYAR, em sua ultima obra (1928), depois de ter descripto a larva de *punctimacula*, tratando da larva de *apicimacula*, diz o seguinte: "similar to that of *punctimacula*, no differential characters having been pointed out".

Entretanto, ROOT, em seu mais recente trabalho (1929), assim se manifesta:

"The larvae of the species of this group are all very similar and difficult to distinguish, although readly identifiable as members of the group by the form of the outer clypeal hair. In Venezuela the author found it possible to distinguish larvae of *punctimacula* and *apicimacula* by the pecten teeth, which showed a regular alternation of long and short teeth in *punctimacula*, while pecten of *apicimacula* always had at least one place where two or three short teeth stood together without intervening long teeth. The pupae of the species I have studied show characteristic differences in the form of their breathing-trumpts, which is not usually the case in other groups".

Que haja differenças caracteristicas entre as pupas de *apicimacula* e *punctimacula*, eu não posso contestar, tanto mais quanto ROOT não as descreve. Todavia, com o conhecimento que tenho das variações que observei nos dentes do pecten, nas larvas de *intermedius* e de *maculipes*, é com certa duvida que acceito as differenças por elle assignaladas nessa peça, como sufficientes para se reconhecer uma ou outra especie.

Nas larvas de *intermedius* e de *maculipes* observa-se o mesmo facto. Emquanto que em *maculipes* ha uma alternancia muito regular de um dente grande e um dente pequeno, como em *punctimacula*, em *intermedius* nota-se, como em *apicimacula*, entre alguns dos dentes grandes, dois ou tres dentes pequenos. Porém, se essa é a disposição geralmente observada, tanto em *intermedius*, como em *maculipes*, ás vezes o pecten se apresenta ora como em *apicimacula*, ora como em *punctimacula*, e, não raro, na mesma larva, ve-se o pecten de um lado como em *apicimacula* e do outro, como em *punctimacula*.

As cerdas clypeaes, notavelmente differentes em *intermedius* e *maculipes*, como se pode ver nas figs. 38 e 39 (Est. XVI), não podem ser tomadas em consideração, quando se procura estabelecer uma distincção entre *intermedius* e *punctimacula*, tanto quanto se pode julgar pelos desenhos de ROOT de taes cerdas em *punctimacula* e *strigimacula*. O mesmo se poderá dizer

em relação ao aspecto das antennas, depois de se comparar a figura desse autor da antenna de *strigimacula* com a de *intermedius* que aqui apresento.

De tudo o que disse resalta a grande semelhança que ha entre *apicimacula* e *punctimacula* e entre *punctimacula* e *intermedius*, sendo esta ultima especie differente de *punctimacula*, principalmente pelo aspecto da terminalia.

Os ovos de *intermedius*, como se pode ver na photomicrographia nº. 37 (Est. XVI) são muito semelhantes aos descriptos por PERYASSÚ, quando tratou de *A. maculipes*. As camaras aereas, collocadas perpendicularmente a superficie do ovo, formam 3 abas salientes.

No meu laboratorio no Instituto obtive, de femeas apanhadas em Estrella, grande numero de ovos, que deram as primeiras larvas 3 ou 4 dias depois da postura. Taes larvas, que se desenvolveram em criadouro artificial, deram, no fim de 26 dias, as primeiras pupas e estas, em menos de 24 horas, os primeiros mosquitos.

As larvas de *Anopheles* distinguem-se facilmente das de *Nyssoshynchus* pela forma dos foliolos dos tufos dorsaes do abdomen. Estes, em *Anopheles*, são mais ou menos recortados nos bordos, em *Nyssorhynchus*, em geral, não apresentam recortes ou entalhes lateraes.

Como verificou ROOT, a caracteristica mais notavel das larvas de *Arribalzagia* é o aspecto ramificado das cerdas lateraes do clypeus.

Se é difficil, como já mostrei, estabelecer-se um caracter differencial entre *apicimacula* e *punctimacula*, ou entre esta e *intermedius*, é relativamente facil, como verifiquei, distinguir-se as larvas de *intermedius* das de *maculipes*.

Primeiramente devo assignalar differenças na coloração das duas larvas. As larvas de *maculipes* são bem mais escuras que as de *intermedius*. A 8a. placa abdominal é uniformemente colorida em *intermedius*, emquanto que, em *maculipes*, apresenta, de cada lado da linha mediana longitudinal, uma mancha negra de contornos irregulares.

O esclerito do segmento anal em *intermedius* é tambem uniformemente colorido e apresenta, na parte posterior e dorsal, dentes pequenissimos. Em *maculipes*, não só ha uma larga mancha escura ao longo da parte dorsal desse esclerito, como se nota distinctamente dentes relativamente robustos na parte posterior, principalmente perto do bordo do referido esclerito.

Já tratei das differenças que apparecem nos dentes do pecten das duas larvas; devo ainda mencionar uma disposição que me parece mais facil de ser percebida no estudo comparado do pecten das duas larvas.

Em *intermedius* os dentes pequenos mais ou menos acompanham a direcção dos grandes; em *maculipes* aquelles apresentam sempre a ponta virada em direcção opposta a dos outros.

As cerdas clypeaes e antennaes são notavelmente mais ramificadas em *maculipes* que em *intermedius*.

As pupas de *intermedius* e de *maculipes* podem ser reconhecidas pelas differenças que ROOT assignala para o lado das tubas respiratorias. Entretanto, ha um caracter que observei, aliás perceptivel com uma boa lente de bolso, pelo qual facilmente se distinguem as duas nymphas. Em

intermedius as palhetas natatorias são claras, emquanto que as de *maculipes* são quasi totalmente enfumaçadas, como se pode ver nas photomicrographias 35 e 36 (Est. XV).

Anopheles (Arribalzagia) fluminensis ROOT, 1927.

Na collecção de anophelineos que estou organisando, ha 2 exemplares que correspondem exactamente á descripção dada por M. ROOT para esta especie. Ella apresenta caracteres geraes de *punctimacula* e de *intermedius*. Pelas grandes escamas das azas, porém, ella se approxima não só de *punctimacula* e de *intermedius*, como de *mediopunctatus*. As mais largas escamas em balão que ha nas azas de *fluminensis*, sendo um pouco mais largas que as de *intermedius*, não são, entretanto, tão largas como as de *mediopunctatus*. Dahi *fluminensis* ter sido entre nós confundido com o verdadeiro *mediopunctatus*. Tenho a impressão de que o mosquito que PERYASSÚ (1921) descreveu como sendo a femea de *Cycloleppteron mediopunctatus*, do qual dá uma boa photomicrographia da aza, originalmente representada na fig. 59 do seu primeiro trabalho (1908) e que THEOBALD tambem reproduz no vol. V. da sua Monographia (fig. 13) como sendo dessa especie, era um exemplar de *fluminensis*. Quando mais tarde (1923) aquelle pesquizador patricio encontrou o verdadeiro *mediopunctatus*, applicou precisamente os caracteres que são typicos de *mediopunctatus* para a sua nova especie *rockefelleri*. Aliás, um especimen macho, criado em 1924 por DAVIS e determinado como *rockefelleri*, apresentava, como verificou ROOT (1927), a terminalia igual a de *mediopunctatus*. Reproduzo aqui a alludida photomicrographia de PERYASSÚ (Est. XIII, fig. 31), que pode ser comparada com as de *fluminensis*, *mediopunctatus* e *intermedius* da nossa collecção.

Um caracter que parece constante em *fluminensis*, alem do aspecto das escamas das azas e que ainda mais a approxima de *punctimacula*, é a cor inteiramente branca do articulo apical dos tarsos. No abdomen não vi, nem ROOT assignala, a presença de escamas amarelladas nos tufos lateraes de escamas negras. Observei, porém, aos lados do 6º e 7º tergitos abdominaes e sobre o 8º urotergito escamas espatuladas relativamente largas (mais estreitas sobre o 8º), de cor branca. Em *intermedius* não se notam taes escamas.

Pelos caracteres citados poder-se-á, pois, distinguir *fluminensis* não só de *intermedius*, como de *mediopunctatus*.

Em Estrella não encontrei esta especie, possuo apenas, como disse, 2 exemplares, um de Goyaz, colhido por NEIVA e outro de Rincão (S. Paulo) colhido por CEZAR PINTO.

A terminalia do macho é, como verificou ROOT (1927), indistinguivel da de *apicimacula*.

ROOT (1927) chama tambem a attenção para a forma das tubas respiratorias da pupa, differentes das de *mediopunctatus*, de *intermedius* e de *maculipes*.

Quanto ás larvas, elle não assignala caracter algum pelo qual se as possa distinguir das demais larvas de *Arribalzagia* até agora conhecidas (*apicimacula* e *punctimacula*).

Anopheles (Arribalzagia) maculipes (THEOB.) (segundo EDWARDS, = *Arribalzagia pseudomaculipes* CHAGAS).

E' tambem uma *Arribalzagia* que commummente se apanha na Baixada Fluminense. Ha occasiões em que *maculipes* e *intermedius* apparecem igualmente e, ás vezes mesmo, *maculipes* é mais abundante que *intermedius*. Numa velha collecção de Arribalzagias que aqui encontrei, apanhadas por NEIVA em Xerem, quasi que só ha exemplares de *maculipes*.

Não obstante ainda não possuirmos dados estatisticos completos sobre a frequencia das varias anophelinas nas zonas palustres, em todos os mezes do anno, tem-se a impressão de que nestas occorre uma certa successão das differentes especies ahi observadas, com predominancia, em cada epoca, de alguma ou algumas sobre outras.

Como *intermedius* e *N. tarsimaculatus*, apanha-se o *A. maculipes* geralmente depois de 18 horas, procurando os lugares em que se acham animaes para pical-os ou as partes bem illuminadas das casas.

Não tive o ensejo de criar no laboratorio este mosquito desde ovo, como o fiz com *A. intermedius*. Todavia encontrámos em Estrella, o Dr. OSWALDO CRUZ FILHO e eu, larvas mais ou menos desenvolvidas num riacho sombreado e com vegetação abundante. Dou aqui photographias do local em que, por varias vezes, colhemos larvas de *maculipes* (figs. 1 e 2, Est. I).

E' de presumir que as larvas de *intermedius* vivam em condições ethologicas semelhantes, porém não consegui apanhal-as, nem no riacho ha pouco referido, nem em outros que cortam a matta nas proximidades de Estrella. Inspeccionámos tambem, GODOY, OSWALDO CRUZ FILHO e eu, varios pantanos e outros fócos de anophelineos, nas cercanias da nossa Estação, sem nelles encontrar uma larva sequer de *intermedius*.

Procurarei novamente estudar esta questão dos focos de *intermedius*, quando voltar a Estrella nos primeiros mezes do anno vindouro.

Tendo já assignalado os caracteres differenciaes entre as larvas e pupas de *intermedius* e de *maculipes*, devo ainda aqui frisar certos caracteres das formas adultas. Incontestavelmente *intermedius* e *maculipes* são tambem duas especies muito proximas. Basta, entretanto, comparar-se as azas para se notar, não somente a disposição diversa das manchas como a differença na largura das grandes escamas basaes. Em *maculipes* taes escamas são notavelmente mais estreitas que em *intermedius*. Alem disso ha ainda a considerar a cor de escamas claras, que em *intermedius* são brancas e em *maculipes* amarelladas ou douradas. As vezes, porém, é difficil julgar-se taes differenças e nestes casos é melhor examinar a reintrancia que se nota ao nivel da juncção da subcostal com a costal. Em *intermedius* essa reintrancia ("kink") é sempre bem accusada, como em *fluminensis* e em *mediopunctatus*; em *maculipes* é quasi imperceptivel, de modo que não se nota, tanto como em *intermedius*, o estreitamento das azas além da reintrancia.

Em *maculipes* os tufos lateraes de escamas abdominaes são constituidos por escamas negras; em *intermedius*, além das escamas negras, ha escamas amarelladas, embora não sejam tão largas e conspicuas como em *mediopunctatus*.

São esses, a meu ver, os melhores caracteres differenciaes entre as 2 especies, em se tratanto de indivíduos femeas. Os machos podem rapidamente ser differenciados pelo exame da terminalia, bastando, para isso, comparar os pequenos foliolos do mesosoma de *intermedius* com os 2 grandes foliolos de *maculipes* (v. desenhos 2 e 3, Est. XVII), observando, para comparação, a pinceta (claspette)).

Anopheles (Arribalzagia) minor LIMA, 1929.

Já tive o ensejo, neste artigo, de tratar desta especie por mim descripta de 2 exemplares apanhados em Estrella. Na nota que publiquei no "Brasil-Medico" fiz uma descripção resumida do que nella encontrei de notavel, baseando-me nos caracteres observados em *maculipes* que é, a meu ver, das nossas especies, a mais proxima de *minor*.

Comparando-a com a redescripção de *Anopheles maculipes*, feita por HOWARD, DYAR & KNAB, verifiquei serem tão insignificantes as differenças entre as 2 formas, que me levaram a suspeitar serem os meus exemplares identicos aos estudados por aquelles especialistas.

Abstenho-me, pois, de dar uma descripção detalhada do insecto, pois, o que nelle se observa, em linhas geraes, é o que se encontra na alludida redescripção.

Apresento aqui photomicrographias das azas de *minor* que poderão ser comparadas, pelos pesquizadores norte americanos, com as azas dos exemplares de *A. maculipes*, HOWARD, DYAR & KNAB (nec. *A. maculipes* THEOB., segundo ROOT, *in litteris*) e assim se estabelecer, de modo definitivo, a identidade de tal forma com a especie por mim estudada.

Possuo actualmente mais quatro exemplares de *A. minor*, 2 femeas e 2 machos, criados por DAVIS e SHANNON na Bahia. As femeas são exactamente identicas as que apanhei em Estrella. Quanto aos machos, cabe a esses autores, que os criaram pela primeira vez, descrever-lhes a terminalia.

CHAVE PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS ESPECIES DE *ANOPHELES* (SUBGENEROS *ANOPHELES* E *ARRIBALZAGIA*) ENCONTRADAS NO BRASIL.

1.	Femeas	2.
1a.	Machos	10.
2 (1)	Tibias do par posterior com uma larga faixa no apice	*eiseni*.
2a.	Tibias sem tal faixa	3.
3 (2a)	Abdomen com tufos lateraes e apicaes de escamas negras, do 2º ao 7º segmentos. Femures e tibias sarapintados	4.
2a.	Abdomen sem taes tufos. Femures e tibias não sarapintados	8.
4 (3)	As grandes escamas das azas, da base ao meio da aza, obovaes largas (em balão)	5.
4a.	Todas as escamas obovaes mais ou menos estreitas	6.

5 (4) Escamas negras dos tufos lateraes do abdomen acompanhadas de escamas espatuladas, mais ou menos largas, de cor amarella ou de ouro. Articulo apical dos tarsos amarello ..... *mediopunctatus*

5a. Tufos lateraes do abdomen sem escamas claras. Articulo apical dos tarsos inteiramente branco ..... *fluminensis.*

6 (4a) Azas com uma reintrancia distincta ao nivel da junção da subcostal com a costal e com as escamas claras quasi todas de cor branca. Tufos lateraes de escamas negras acompanhadas de algumas escamas espatuladas claras ..... *intermedius.*

6a. Azas com tal reintrancia pouco nitida ou sem ella e com as escamas claras quasi todas amarelladas ou cor de ouro. Tufos lateraes de escamas negras não acompanhadas de escamas espatuladas claras ..... 7.

7 (6a) Mosquito grande (4,50 a 4,75 mm. de aza). Palpos com varias escamas claras nas articulações e esparsas nos segmentos, entre as negras; tarsos posteriores, vistos pelo lado dorsal, sarapintados, especialmente o 1º (metatarso) e o 2º articulos; os demais apresentam distinctamente uma faixa dorsal e uma apical, alem de uma ou outra faixa intercallar; abdomen sem escamas claras nos segmentos apicaes ..... *maculipes.*

7a. Mosquito pequeno (3 mm. de aza). Palpos quasi que inteiramente revestidos de escamas negras, apenas uma ou outra escama clara, em toda a extensão dos palpos, no meio das escamas negras; tarsos posteriores não sarapintados; apenas o 1º (metatarso) com 5 ou 6 pintas equidistantes; os demais somente com uma distincta faixa clara no apice (na base ve-se, com forte augmento) um estreito annel claro confundindo-se com a faixa ou anel apical do articulo precedentes; 8º urotergito e segmentos genitaes revestidos de escamas claras (cor de palha ou de ouro)..... *minor.*

8 (3a) Mesonoto sem manchas escuras e os ultimos urotergitos sem escamas..... *mattogrossensis.*

8a. Mesonoto com 3 manchas escuras e os ultimos urotergitos com escamas..... 9.

9 (8a)	Setimo, oitavo e nono urotergitos revestidos de escamas brancas (aspecto de cinza de charuto).....	*peryassui.*
9a.	Os mesmos urotergitos revestidos de escamas amarelladas...*celidopus* (?=*A. alagoanii* PERYASSÚ, 1925).	
10 (1a)	Espinhos basaes da terminalia modificados em duas grandes laminas ponteagudas e encurvadas; pincetta (claspette) de aspecto caracteristico (vid. figs. de BONNE e de SOUZA PINTO).....	*mediopunctatus.*
10a.	Espinhos basaes e pincetta de aspecto differente do observado na especie acima.....	11.
11 (10a)	Com um par de grandes foliolos "que devem ter a forma de um *V* em secção transversal, pois se apresentam, vistos de perfil, largos e com as margens serradas" (ROOT)....	*eiseni.*
11a.	Mesosoma com os foliolos simples, não distinctamente serrados.....	12.
12 (11a)	Os dois foliolos apicaes grandes, do tamanho ou um pouco maiores que a pincetta.....	13.
12a.	Os dois foliolos apicaes bem menores que a pincetta.....	*intermedius.*
12 (12)	Apenas os 2 grandes foliolos apicaes, ou estes acompanhados de cerdas quasi imperceptiveis.....	*maculipes.*
13a.	Os grandes foliolos apicaes acompanhados, de cada lado, por 3 ou 4 foliolos gradativamente mais curtos e mais finos.....	14.
14 (13a)	Os 2 foliolos apicaes distinctamente emarginados.	*punctimacula.*
14a.	Os 2 foliolos apicaes (?) não emarginados.. ...	*fluminensis.*

Manguinhos, Novembro de 1929.

As photomicrographias ns. 40 e 41 (Est. XVIII) representam a terminalia completa e as peças intermediarias destacadas desse apparelho, tiradas de dois exemplares de *Stethomya nimba* da antiga collecção do Instituto, sem indicação de procedencia.

Taes exemplares acham-se actualmente nos vidros 433 e 434 da nova collecção e as alludidas preparações montadas nas laminas 795 e 996.

Alem desses exemplares possuimos mais alguns outros, em optimo estado de conservação, que se acham nos vidros 441 e 444. Estes ultimos foram-nos cedidos pelos Dr. DAVIS e SHANNON, que os apanharam na Bahia.

O exame do referido material e sobretudo o estudo que fiz da genitalia dos machos da velha collecção, autorizam-me a considerar *Stethomyia* um genero distincto de *Anopheles*.

De facto, alem de se tratar de uma especie de aspecto bem differente dos demais anophelineos, as peças intermediarias da terminalia do macho se apresentam com caracteres tão singulares, que não vejo motivo para que se a considere n'uma subdivisão do genero *Anopheles*, a menos que só se admitta *Anopheles* como cathegoria generica unica na tribu Anophelini, o que não me parece razoavel, como já tive o ensejo de ponderar em trabalho anterior.

Comparando as nossas preparações com a figura da genitalia de *Stethomyia nimba* apresentada por BONNE (1925), notei algumas differenças, que se não se correrem por conta de uma diversidade especifica ou—o que é menos provavel—de uma observação imperfeita d'aquelle pesquizador, indicam tratar-se de uma outra especie de *Stethomyia*. Segundo a descripção e desenho de BONNE, a cerda mais robusta da peça lateral se insere no tarço basal e a mais fina no terço apical. Nos nossos especimens as 2 cerdas se inserem no mesmo nivel. A pincetta (claspette), segundo o desenho de BONNE, é fendida ao meio e se apresenta com o aspecto de 2 appendices foliaceos. Nas nossas preparações ve-se que ella é tambem fendida ao meio e constituida por 2 laminas juxtapostas, porem o aspecto do orgão lembra o da cabeça de um avestruz. O mesosoma, tal como se vê nos nossos preparados, apresenta na porção apical, uma extremidade chitinisada e losangiforme, e, de cada lado, uma expansão tambem chitinisada e ponteaguda.

Sendo os caracteres da terminalia observados no nosso material identicos ao que se vê nos desenhos de THEOBALD, autor da especie *nimba*, devo concluir que os exemplares observados por BONNE, se realmente apresentam a genitalia differente da dos nossos especimens, devem ser de uma outra especie.

Aproveito o ensejo para aqui incluir uma observação interessante, feita por GODOY, sobre a postura de um anophelineo do genero *Nyssorhynchus*. O facto, por elle observado a 29 de Junho do anno passado, ás 3 horas da tarde, foi-me assim communicado:

"Não tendo um exemplar de anophelina querido se alimentar em coelho tentei fazer com que sugasse sangue desfibrinado de carneiro embebendo algodão. Collocado o algodão sobre um pedaço de papelão e o tubo com o mosquito sobre elle. Observando com uma lente vi que elle fazia esforços para sugar e ao mesmo tempo fazia postura. O corpo do mosquito mantinha-se recto e formava com o supporte um angulo de cerca de 40° occupando a cabeça e o vertice desse angulo. Os ovos eram emittidos lentamente e cahiam pelo proprio peso. O intervallo de tempo entre a postura de um e outro ovo era de 10 a 15 segundos. Observei a postura de 20 ovos, que eram inteiramente brancos, brilhantes e sem qualquer camada protectora. Os ovos que foram postos formaram um pequeno agglomerado, igual ao que tenho visto sobre areia humida.

Esta é, penso, a primeira observação que se fez directamente da postura de uma anophelina, sendo já muito antiga a descripção da postura de *Culex*.

Notei ainda que este exemplar, assim como outro havia estado dias sobre uma superficie com agua, não havia feito postura alguma, o que está

de accordo com a idéa, já varias vezes lembrada, de que as anophelinas não fazem a postura directamente sobre a agua, mas sobre superficie humida, sendo os ovos levados pela chuva aos creadouros".

Ao concluir estas notas devo aqui consignar os meus agradecimentos ao Dr. FREDERICO SOPER, da Rockfeller Foundation, pelas valiosas informações que me transmittio; ao Dr. JURADO, Director do Museu Nacional de Buenos Aires, por me ter facilitado o exame do material typico de BRÈTHES do seu *Anopheles annulipalpis* e ao Dr. OLYMPIO DA FONSECA FILHO, pelo muito que contribuio para que eu pudesse examinar o referido material.

Devo tambem declarar que as principaes observações contidas neste meu trabalho foram feitas no nosso Posto Experimental de Malaria, em Estrella, mantido por este Instituto e com o auxilio do Serviço Sanitario do Estado do Rio.

BIBLIOGRAPHIA

ARRIBALZAGA, F. L. 1891—Dipterologia Argentina (Extracto del tomo I. p. 345 y siguientes Rev. Mus. de La Plata). Talleres del Museo de La Plata.

BEQUAERT, J. 1926 – Medical and economic entomology, in – Medical Report of the Hamilton Rice seventh expedition on the Amazon, in conjunction with the Department of Tropical Medicine of Harvard University, 1924—1925. Contributions from the Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine, nº. IV. Cambridge; Harvard Univ. Press.

BONNE, C. 1923 – The male hypopygum of *Anopheles mediopunctatus* THEOB. Tijds. v. Entomol., **66**: 115—117, 1 fig.

BONNE, C. 1923 — The eggs of *Anopheles mediopunctatus* THEOBALD. Tijds. v. Entomol., **66**: 118, 1 fig.

BONNE, E. & BONNE-WEPSTER, J. 1925—Mosquitoes of Surinam, Royal Colonial Institute of Amsterdam. 558 p., 84 figs.

BOYD, M. F. 1926—Studies of the epidemiology of malaria in the coastal lowlands of Brazil, made before and after the execution of control measures. Amer. Jour. Hyg. Monographic Ser. nº. 5.

BRÈTHES. J. 1916—Algumas notas sobre mosquitos argentinos. Ann. Mus. Nac. Hist. Nat. Buenos Aires, **28**: 193—218.

CHRISTOPHERS, S. R. 1923 – An Anopheles of the *Myzorrhynchus* Group (*Anopheles amazonicus*, sp. n.) from South America. Ann. Trop. Med. and Parasit., **17**: 71—78., pl. IV.

CHRISTOPHERS, S. R. 1924—Provisional list and reference catalogue of the Anophelini. Ind. Med. Res. Mem. nº. **3**: 105 pp.

COSTA LIMA, A. da, 1928—Sobre algumas anophelinas encontradas no Brasil. Instituto Oswaldo Cruz. Suppl. das Mem., **3**, novembro: 91 – 113, figs. 9 – 25.

COSTA LIMA, A. da, 1929—Sobre um novo Anopheles do Brasil. Brasil Medico, **43**: 1100—1101.

CRUZ, O. G. 1907—Um novo genero brazileiro da sub-familia "Anophelinae". Braz Med., **21**: 271—273.

DYAR, H. G. 1918—Notes on american Anopheles. Insec. Insc. Menst., **6**: 141—151.

DYAR, H. G. 1928—The mosquitoes of the Americas. Carnegie Inst. Washington. Pb. **387**: 616 p., 123 pl.

EVANS, A. M. 1922—Notes on Culicidae in Venezuela, with descriptions of new species. Part. II. Ann. Trop. Med. and Parasit., **16**: 213—222. Pl. XI.

EVANS, A. M. 1923—Notes on Culicidae in Venezuela with descriptions of new species. Part. III. Ann. Trop. Med. and Parasit., **17**: 101—111.

FREEBORN, S. B. 1924—The terminal abdominal structures of male mosquitoes. Amer. Jour. Hyg., **4**: 188—212, 18 figs.

GILES, G. M. 1904—A revision of the Anophelinae. Being a first supplement to the second edition of "A handbook of the gnats or mosquitoes", 47 p. London: John Bale, Sons & Danielson.

HOWARD, L. O., DYAR, H. G. e KNAB, F. 1917—The mosquitoes of North and Central America and the West Indies, Carnegie Inst. Washington. Publ. **159**. 4.

NEIVA, A. 1915—Contribución al estudio de los Anofelinos Argentinos. (Extr. de la Semana Medica, nº. **48**): 11 p. Buenos Aires: "La Semana Medica" Imp. de Obras de E. SPINELLI, 845 Junnin.

NEIVA, A. y BARBARÁ, B. 1917—Mosquitos argentinos. Buenos Aires: 7 p. Imprenta Flaiban y Camilloni, 747 Cerrito.

PERYASSÚ, A. G. 1908—Os culicideos do Brazil. 407 p. Rio de Janeiro: Typ. Leuzinger.

PERYASSÚ, A. G. 1921—Os Anophelineos do Brasil. Publicação extrahida dos Arch. Mus. Nac., **28**: 99 p., 29 fig. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.

PERYASSÚ, A. G. 1923—Uma nova especie de Anophelineo do genero Cyclolepidopteron. A Folha Medica. **4**: 68—69, 1 fig.

PERYASSÚ, A. G. 1925—*Anopheles alagoani* (n. sp.) PERIASSÚ. A Folha Medica. **6**: 258—259.

PINTO, C. 1923—Anophelineos de Angra dos Reis. Braz. Med. **37**: 77—81, 10 fig.

ROOT, F. M. 1922—The larvae of american Anopheles mosquitoes, in relation to classification and identification. Amer. Jour. Hyg., **2**: 379—393. Pl. 14—15.

ROOT, F. M. 1923—The male genitalia of some american Anopheles mosquitoes. Amer. Jour. Hyg., **3**: 264—279. Pl. 7—11.

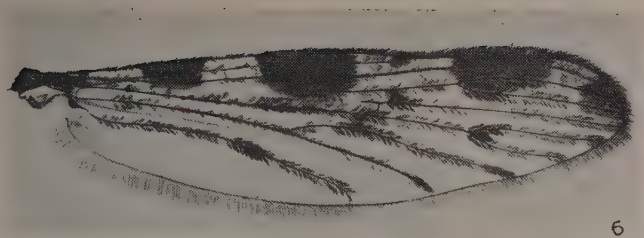
ROOT, F. M. 1924—Further notes on the male genitalia of americam Anopheles. Amer. Jour. Hyg., **4**: 456—465. Pl. 5—7.

ROOT, F. M. 1927—Studies on brazilian mosquitoes. IV. Notes on some brazilian species of Anopheles. Amer. Jour. Hyg. **7**: 599—605. Pl. 14—15.

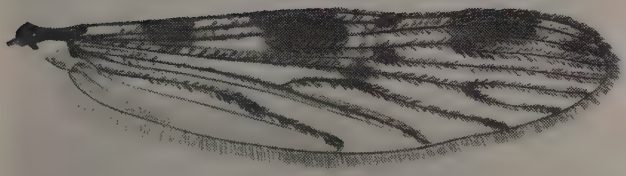
Figs. 1 e 2—Vistas de um riacho, fóco de *Anopheles maculipes*. Estrella.
(Phot. J. Pinto).

Fig, 1—*Anopheles peryassui*. Burity das Mulatas.
Fig. 2—*Anopheles celidopus*. Xerem.
Fig. 3—*Anopheles celidopus*. Bahia.
Fig. 4—*Anopheles punctimacula* (*malefator*).
Fig. 5—*Anopheles fluminensis*. Rincão.

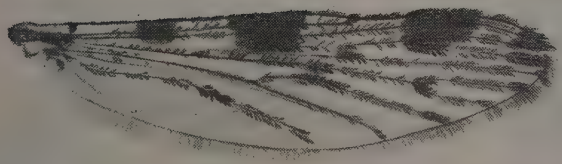
(Photomicr. J. Pinto).



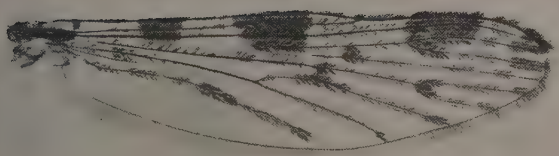
6



7



8



9

Fig. 6—*Anopheles intermedius.* Angra dos Reis.
Fig. 7—*Anopheles intermedius.* Estrella.
Fig. 8—*Anopheles intermedius.* «
Fig. 9—*Anopheles intermedius.* «

(Photomicr. J. Pinto).

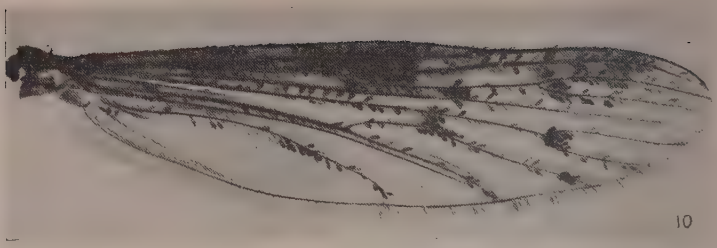


Fig. 10—*Anopheles mediopunctatus*. Estrella.
Fig. 11—*Anopheles minor*. Estrella.
Fig. 12—*Anopheles maculipes*. Estrella.
Fig. 13—*Anopheles maculipes*. «
Fig 14—*Anopheles maculipes*. «

(Photomicr. J. Pinto).

Fig. 15—*Anopheles peryassui*. Parte da aza da fig. 1 (Estampa II), ampliada
Fig. 16—*Anopheles celidopus*. « « « « « 2 (« II), «
(Photomicr. J. Pinto).

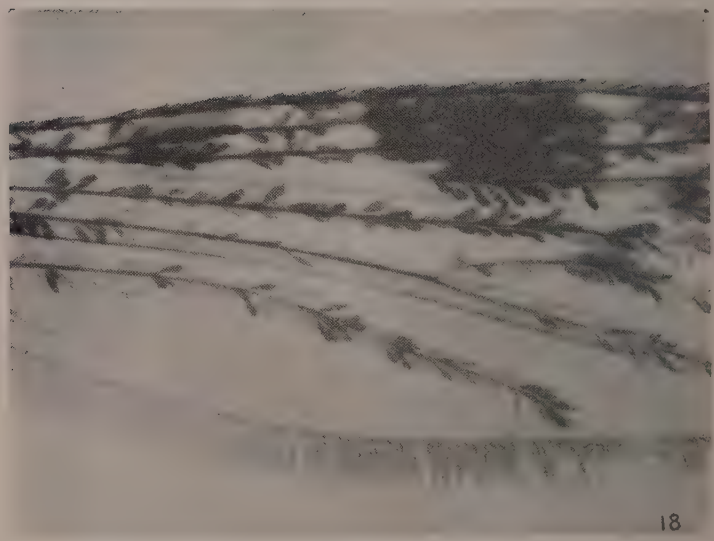


Fig. 17—*Anopheles celidopus* Parte da aza da fig. 3 (Estampa II), ampliada.
Fig. 18—*Anopheles punctimacula.* « « « « « 4 (« II), «
(Photomicr. J. Pinto).

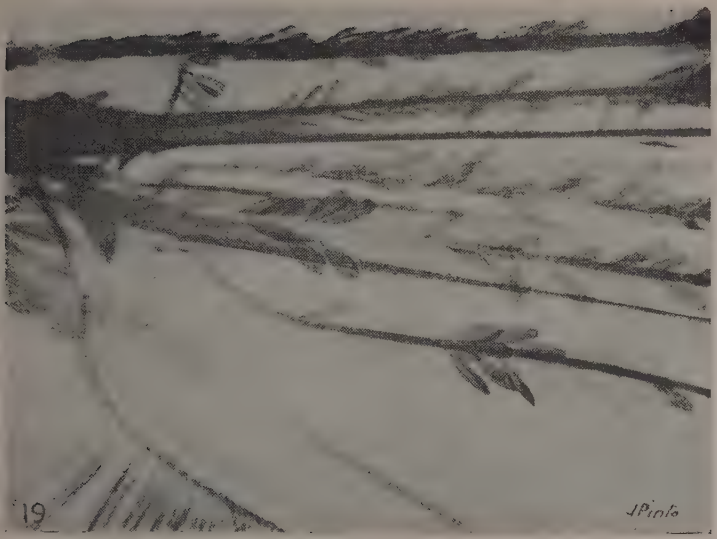
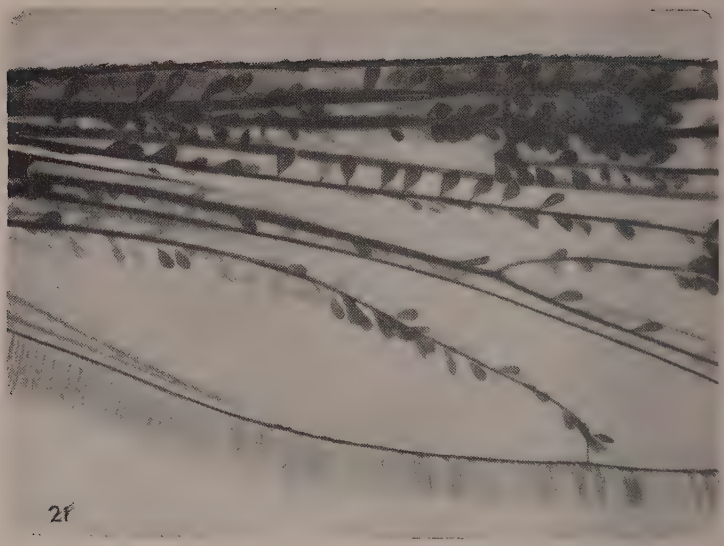


Fig. 19—*Anopheles peryassui*. Base da aza da fig. 1 (Estampa II), fortemente augmentada.
Fig. 20—*Anopheles celidopus*. « « « « « 3 (« II), « «
(Photomicr. J. Pinto).



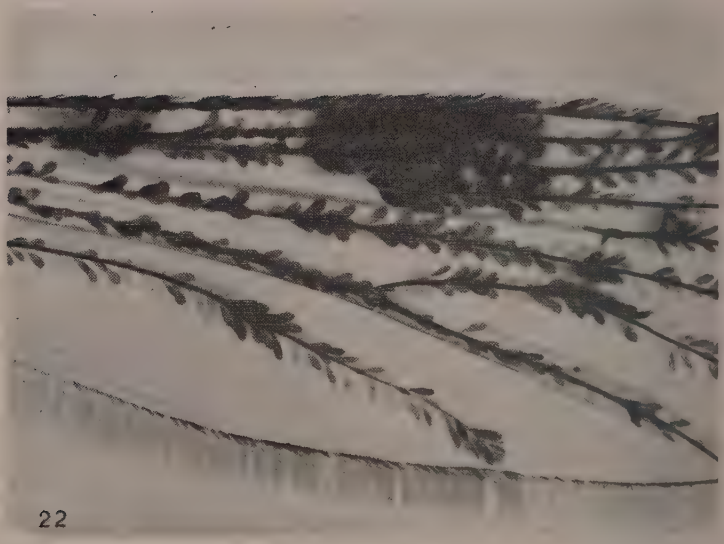


Fig. 21—*Anopheles mediopunctatus*. Parte da aza da fig. 10 (Estampa IV), ampliada.
Fig. 22—*Anopheles flum nensis*. « « « « « 5 (« II), «
(Photomicr. J. Pinto).

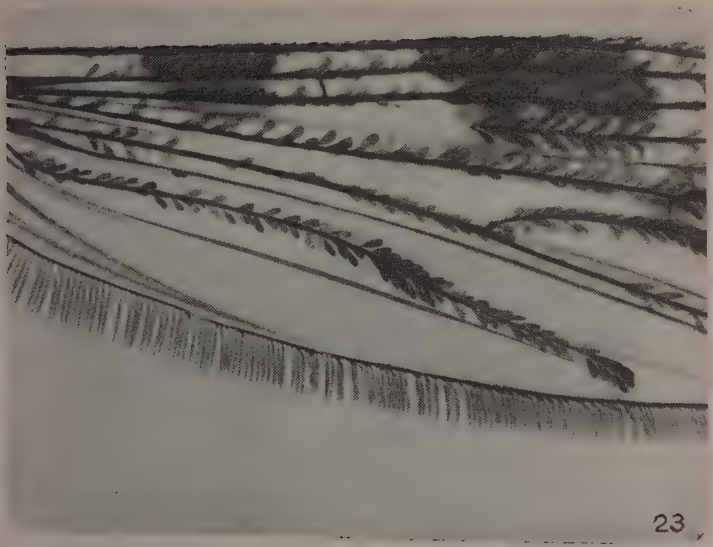
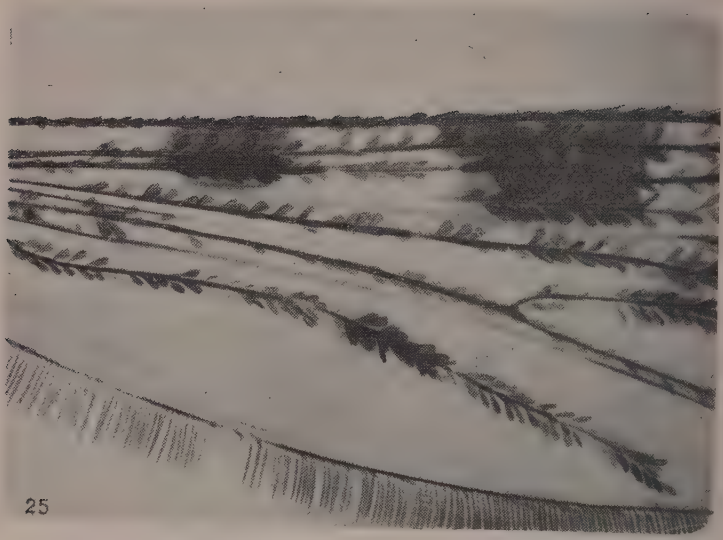


Fig. 23—*Anopheles intermedius*. Parte da aza da fig. 7 (Estampa III), ampliada.
Fig. 24—*Anopheles intermedius*. « « « « « 6 (« « III), « «
(Photomicr. J. Pinto)



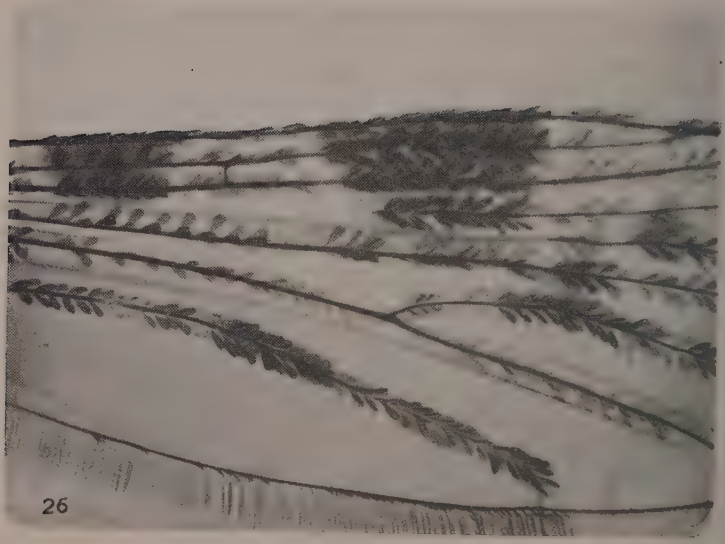
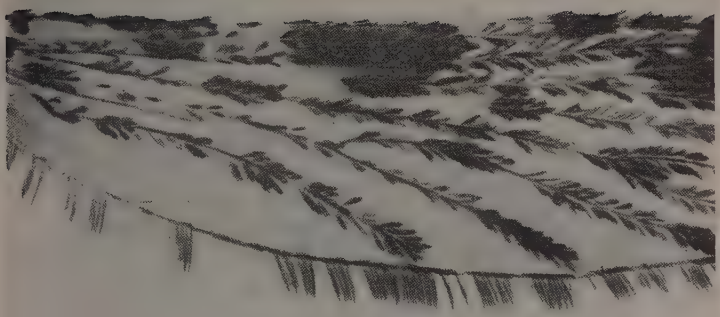
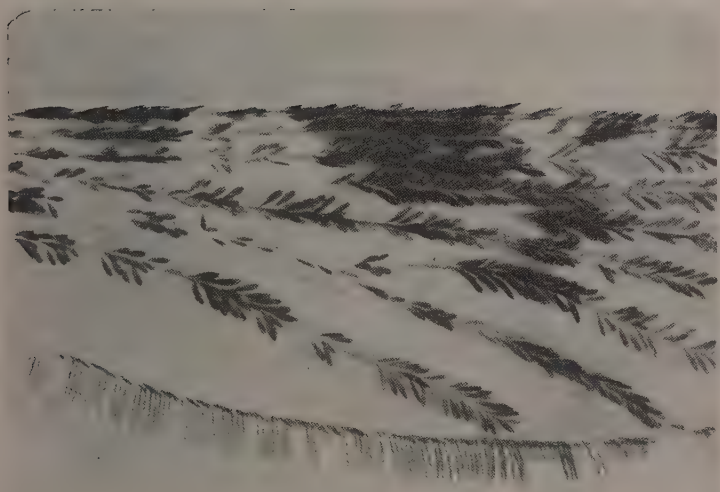


Fig. 25—*Anopheles intermedius*. Parte da aza da fig. 8 (Estampa III), ampliada.
Fig. 26—*Anopheles intermedius*. « « « « « 9 (« III), «
(Photomicr. J. Pinto.)



26



27

Fig. 26—*Anopheles minor*. Parte da aza ampliada.
Fig. 27—*Anopheles maculipes*. Parte da aza da fig. 13 (Estampa IV), ampliada.
(Photomicr. J. Pinto).

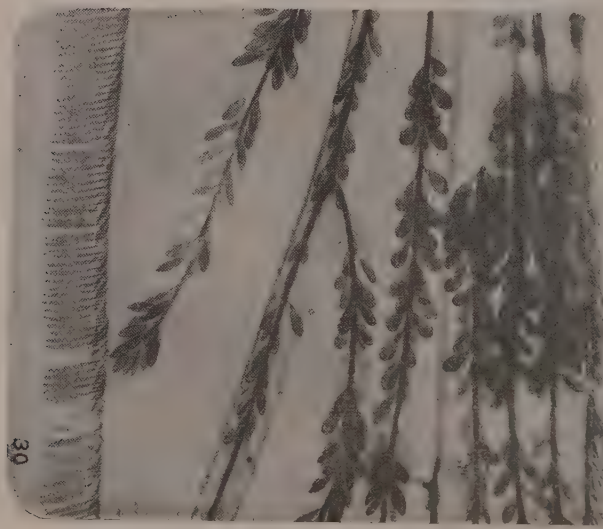
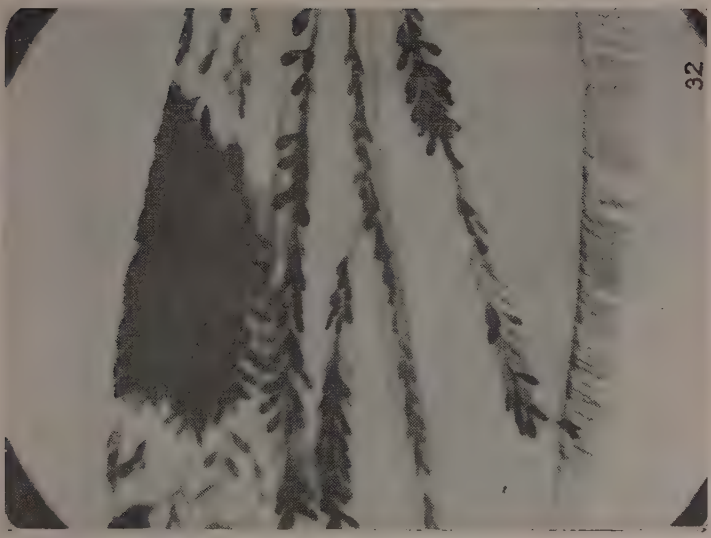


Fig. 29 -*Anopheles mediopunctatus*. Parte da aza da fig. 10 (Estampa IV), ampliada.
Fig. 30—*Anopheles fluminensis*. « « « « « 5 (« II),
(Photomicr. J. Pinto).



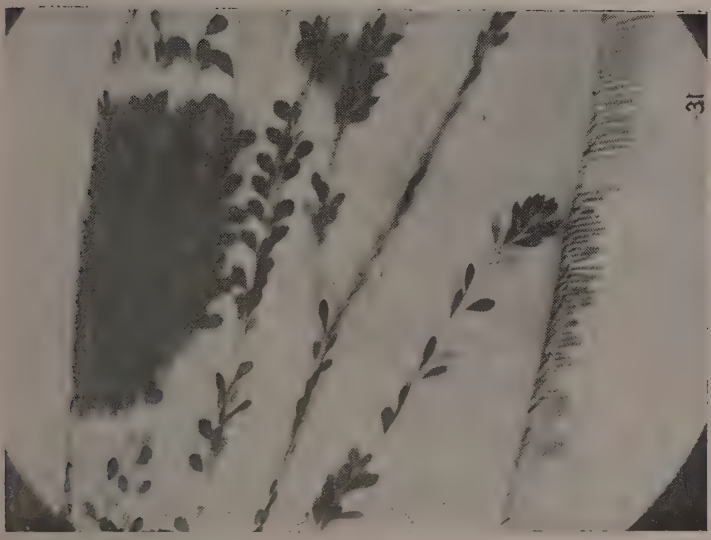


Fig. 31— ? *Anopheles mediopunctatus* (segundo PERYASSÚ).
(Compare-se esta photomicrographia com as 2 precedentes).
Fig. 32—*Anopheles intermedius* (segundo PERYASSÚ)
(Photomicr. J. Pinto).

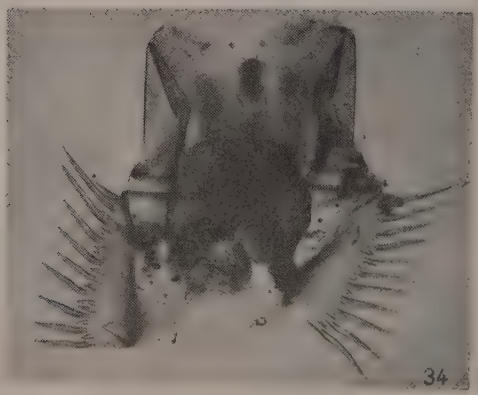


Fig. 33—*Anopheles maculipes*. Pectens e segmento anal da larva.
Fig. 34—*Anopheles maculipes*. Pectens da larva, mais augmentados.
(Photomicr. J. Pinto).

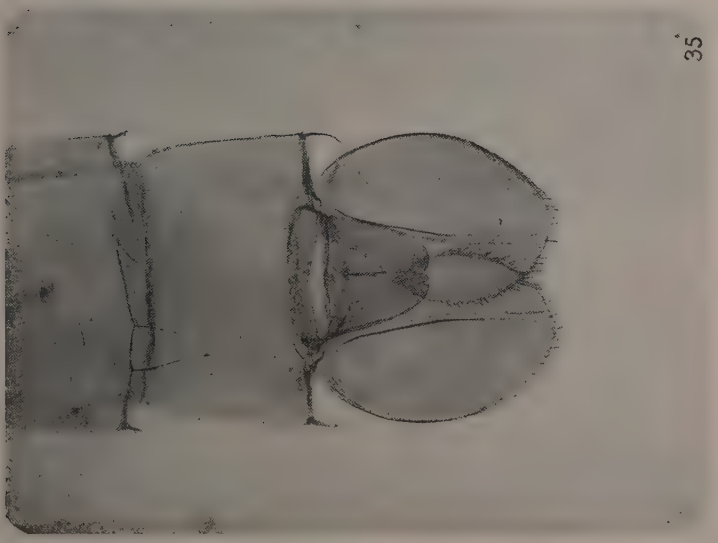
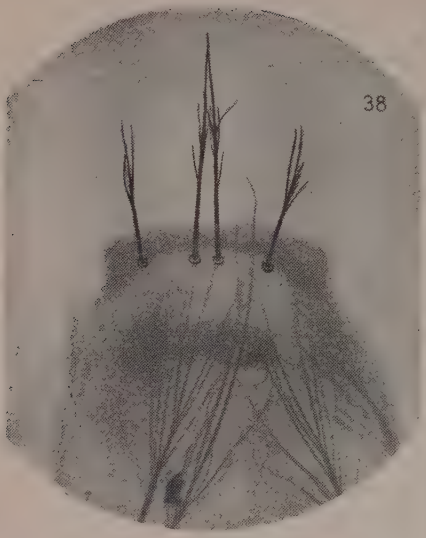


Fig. 35—*Anopheles intermedius*. Segmentos terminaes da pupa.
Fig. 36—*Anopheles maculipes*. « « « «
(Photomicr J. Pinto).



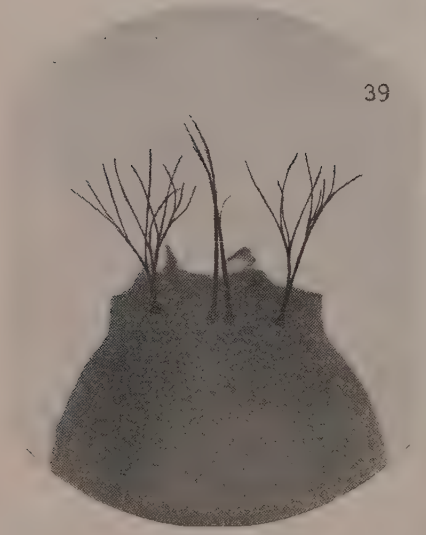


Fig. 37—*Anopheles intermedius*. Ovos.
Fig. 38—*Anopheles intermedius*. Cerdas clypeaes.
Fig. 39—*Anopheles maculipes*. « «

(Photomicr. J. Pinto).

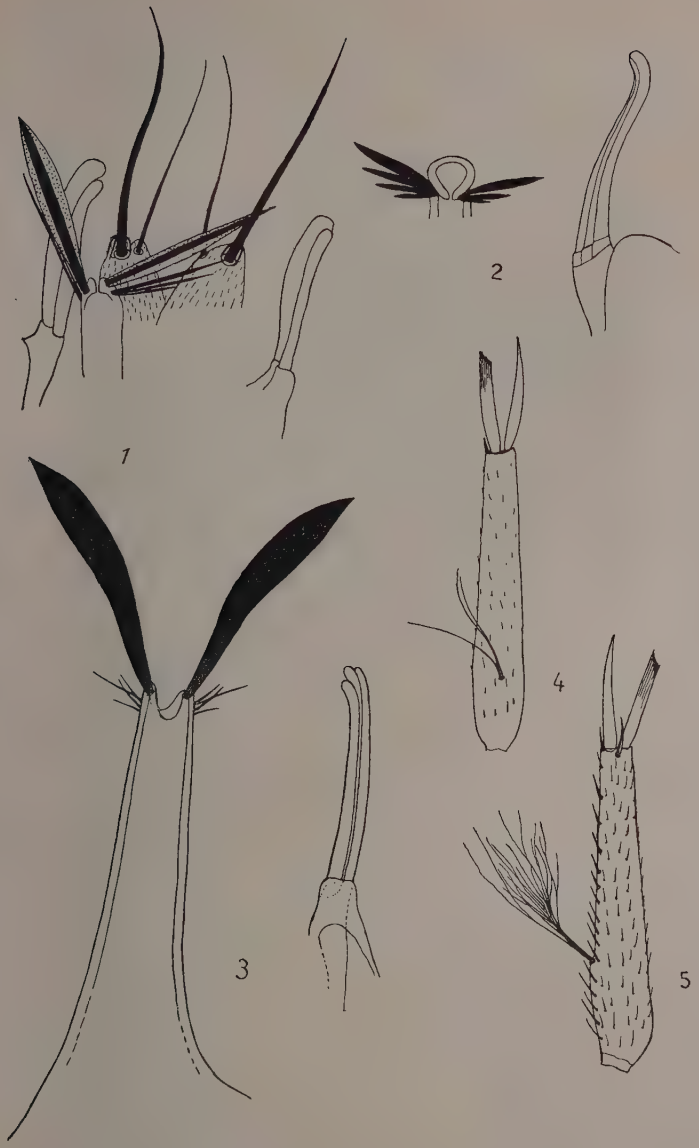


Fig. 1—*Anopheles punctimacula*. Parte da terminalia.
Fig. 2—*Anopheles intermedius*—Extremidade do mesosoma e "claspette".
Fig. 3—*Anopheles maculipes*. « « « « «
Fig. 4—*Anopheles intermedius*. Antenna da larva.
Fig. 5—*Anopheles maculipes*. « « « «

(Desenhos á camara clara).

Fig. 40 —*Stethomyia nimba*. Terminalia.
Fig. 41—*Stethomyia nimba*. Peças intermediarias da terminalia ampliadas.
(Photomicr. J. Pinto).

ROOT, F. M. 1929—Medical Entomology (Section III), in HEGNER, R. ROOT, F. M. & AUGUSTINE, D. L.—Animal Parasitology, 731 p., 280 fig. New York—London: The Century Co.

SHANNON, R. C. y DEL PONTE E. 1927—Los culicidos en la Argentina. Rev. Inst. Bact. Dept. Nac. Hig. **5**: 29—140., 14 fig.

SOUZA PINTO, G. 1925—Sobre um novo methodo de identificação dos anophelineos. Estudos sobre o hypopygio de alguns anophelineos brasileiros, D. N. S. P. Serviço de Saneamento Rural no Estado do Rio de Janetro. Publ. **2**; 21 p., 5 fig.

On the reproductive capacity of mice after hypophyseal implants

By THALES MARTINS, M. D.

From the Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute.

The attempts for fecundating infantile animals, precociously matured after hypophyseal implants, have resulted in a failure (SMITH and ENGLE, ZONDEK and ASCHHEIM; see our former papers).

The infantile animals precociously matured in this way, have the essential conditions for reproduction, that is to say: complete ovulation, as may be seen by the presence of tubal ova; histologic alterations of the uterus and vagina, identical to the estral condition of adult animals. Adult males can mate these infantile females, as is proved by the presence of vaginal plugs with sperma; but a pregnancy has never been reported in such cases.

The ovarian alterations after hypophyseal implants are marked to such an extent, that one might doubt of the ulterior reproductive capacity of the organ.

EXPERIMENT.

Female mice, three weeks old, weighing 6,5 grams. One animal was implanted with two anterior lobes of hypophysis from adult female rabbits, with an interval of three days. We observed opening of the introitus and full estrus during about four days. Laparotomy showed a great hypertrophy of both ovaries and uterus. On the surface of the ovaries, many corpora lutea were seen. The abdominal cavity was closed again and the animal kept alive.

The mous remained in diestrus for a period of about six weeks afterwards, when the normal puberty appeared; the body weight was then of about 13 grams. When it reached the weight of 19 grams, it was put together with a normal adult male mous and one female of the same litter. Both the female mice became pregnant. Parturition of the control occurred one day after that of the implanted animal. The litters were as follows:

Implanted animal:—four females and three males;

Control:—four males, one female.

All the young animals were apparently normal.

When 23 days old, the weights were as follows: 5 to 5,5 grams for those of the implanted litter; 7 to 7,5 for the control litter.

There is, consequently, a marked difference in weights, but not seldom, we find in our mice colony normal animals, about three weeks old, with such a weight as 5,5 grams.

To conclude, this experiment demonstrates that the precocious sexual maturity induced by hypophyseal implants, at least to a certain extent, involves no impossibility of future fecundation and normal pregnancy and parturition, when the animal reaches the normal adult condition.

SOBRE DOIS MANTIDEOS POUCO CONHECIDOS

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA

Ha dias o Dr. GOMES DE FARIA apanhou, perto do meu laboratorio, um "louva-deus" cujo aspecto não é muito commum dos insectos da ordem Mantodea.

Trata-se de uma femea adulta, de tegminas extremamente atrophiadas, quasi imperceptiveis. Procurando determinal-a verifiquei ser a especie *Eumusonia livida* (SERVILLE) GIGLIO-TOS (Subfam. *Parathespinae*, grupo *Musoniae*).

Esta especie foi descripta por SERVILLE em 1839 com o nome de *Thespis livida* (Hist. Nat. Ins. Orth., p. 172) de um exemplar macho procedente do Brasil. Annos depois (1871) SAUSSURE incluio-a no genero *Miopteryx*, por elle creado em 1869. No anno anterior, porem, elle havia descripto (Mitth. schweiz. ent. Ges., III, 238), como nova especie, um exemplar femea do mesmo insecto, capturado em Goyaz, com o nome de *Thespis* (!) *caudata*, o qual foi considerado provisoriamente no seu trabalho de 1871 (p. 136) como *Brunneria* ? *caudata*.

Ficou assim o insecto com 2 nomes: um referente ao macho — *Miopteryx livida* (SERV.) — e outro relativo a femea — *Brunneria* (?) *caudata* (SAUSS.). Ulteriormente (1900) GIGLIO-TOS descreveu o mesmo insecto com o nome de *Musonia cubensis* e KIRBY em seu "Catalogo" (1904) tambem considerou *M. livida* e *B. caudata* como especies distinctas.

GIGLIO-TOS, mais tarde, na sua revisão dos mantideos exoticos (Bull. Soc. Ent. Ital., XLII (1915) creou o genero *Eumusonia*, cujo typo é *Thespis livida* SERV., mostrando então a identidade de *Thespis caudata* com *T. livida*. Dessa data em diante, a unica referencia que se encontra sobre o insecto é a que se acha na obra de GIGLIO-TOS sobre os mantideos, publicada no "Das Tierreich" (1927) pag. 222.

Achando interessante o insecto, resolvi mantel-o vivo para ver se podia obter a ootheca. Colloquei-o numa cuba (11—9—1929) dando-lhe moscas domesticas vivas para se alimentar. Em pouco mais de uma hora ella conseguio devorar totalmente 6 moscas. Depois disso o insecto ficou apparentemente saciado. Após esse primeiro repasto, que se deu á tarde, ficaram 10 moscas. No dia seguinte (12) verifiquei que haviam sido devoradas 5. No dia immediato (13) devorou mais 4 e nos 6 dias seguintes, ainda comeu 15 moscas. A 19 encontrei-o muito enfraquecido e nesse mesmo dia morreu. Em 8 dias, pois, que o mantive em captiveiro, devorou 30 moscas, apezar de ter sempre a sua disposição e em espaço confinado grande numero desses insectos.

O facto de ter sido aqui encontrado este exemplar parece indicar que a especie deve tambem existir no Rio de Janeiro, alem do Estado distante em que elle fora apanhado anteriormente (Goyaz).

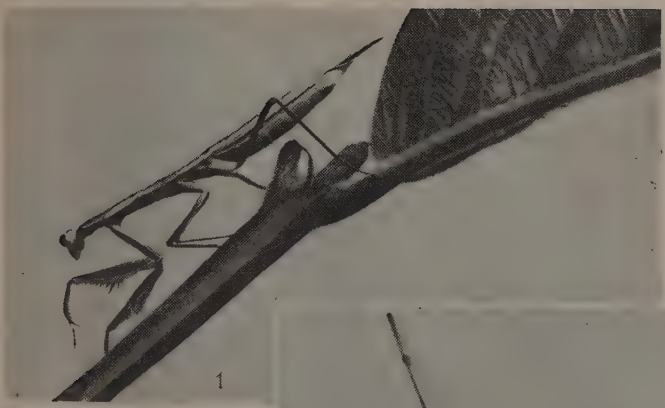
Entretanto, devo aqui mencionar a coincidencia interessante do apparecimento do insecto na porta do meu laboratorio, com o regresso do

meu collega Dr. PENIDO de uma viagem que fez a Goyaz. Os nossos laboratorios são visinhos e como elle transportou para o delle algumas malas carregadas de material, é possivel que o insecto tenha sido transportado de Goyaz até aqui (1).

Aproveito o ensejo para dar aqui algumas photographias (3, 4 e 5), tiradas pelo Snr. SANTOS LAHERA, de um dos nossos mais interessantes mantideos, principalmente pelas attitudes curiosas que elle toma, quando se o colloca n'um plano qualquer. Refiro-me a especie *Acanthops erosa* SAUSS., 1839 (= *A. contorta* GERSTÄCHER, 1889), da qual possuo 2 exemplares, um bem escuro, por mim apanhado em Niteroi e outro mais claro, apanhado no Alto da Boa Vista (Tijuca) pelo menino CARLOS ALBERTO SEABRA.

---

(1) Já estava composto este artigo, quando, em fins de Novembro e perto do Instituto, o Dr. CEZAR PINTO apanhou um mantideo que verifiquei ser o macho alado de *E. livida*. Fica assim provado que esta especie tambem se encontra no Rio de Janeiro.



Figs. 1 e 2—*Eumusonta livida* (tamanho natural ; phot. J. Pinto).
Figs. 3, 4 e 5—*Acanthops erosa* (« « ; phot. Santos Lahera).

Sobre algumas especies de MANSONIA encontradas no Brasil

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA

Em 1912, dirigindo o serviço de combate a febre amarella em Santarem e Obidos (Baixo Amazonas), tive o ensejo de fazer algumas observações sobre a biologia de alguns dos culicideos mais frequentemente encontrados nessas cidades. Nesse epoca, os mosquitos que mais as infestavam eram as especies do genero *Mansonia* BLANCHARD, subgenero *Mansonia* BLANCHARD. Todos os dias surgiam, em maior ou menor quantidade, a *M. amazonensis* (THEOB.) (1), a *M. pseudotitillans* (THEOB.) e a *M. titillans* (WALK.). Todavia, quasi sempre, as duas primeiras especies appareciam em maior abundancia. Taes mosquitos, criados principalmente em pantanos situados á margem do rio e a leste da cidade, invadiam as casas ás 6 horas da tarde, approximadamente, prolongando-se essa invasão até as 7 ou 8 horas da noite.

Penetrando nas habitações, ou procuravam picar immediatamente, ou o faziam mais tarde, depois de terem pousado sobre uma parede durante algum tempo.

A picada das Mansonias, como a das especies do subgenero *Rhynchotaenia* BRÈTHES, é extremamente dolorosa.

O vôo destes mosquitos não é muito rapido e é com relativa facilidade que se os pode apanhar voando.

Pousando n'uma parede, podem apresentar duas posições differentes. Se estão por pouco tempo, ficam com os demais culicideos, elevando e abaixando alternadamente as 2 pernas posteriores. Quando, porém, procuram repousar, apresentam uma attitude que lhes é peculiar e que aqui eschematizo na figura nº. 5.

As Mansonias picam a qualquer hora do dia ou da noite, mesmo atravéz do tecido da vestimenta, quando este repousa sobre a pelle. A' noite picam, dentro ou fóra das habitações, geralmente das 6 horas, pouco mais ou menos, até a meia noite. Pela manhã é raro encontrar-se uma Mansonia dentro de casa. Um ou outro exemplar que fique e que não tenha sugado sangue, pode picar a qualquer hora do dia.

Durante o dia as Mansonias são encontradas abundantemente e picam em qualquer occasião nas mattas circumvisinhas aos pantanos fócos dos quaes se originam. Em Santarem taes fócos, como disse, se achavam a leste da cidade e a mais de um kilometro de distancia.

---

(1) DYAR, em seu ultimo trabalho sobre mosquitos das Americas (1928), inclue a especie *chrysonotum* PERYASSÚ, 1922, na synonymia de *amazonensis*. Posso dizer, com absoluta segurança, que as duas especies são inteiramente differentes, pertencendo *chrysonotum* ao subgenero *Rhynchotaenia*.

Os mosquitos oriundos desses fócos, anophelineos e culicineos, ao crepusculo, vinham voando e invadiam primeiramente a parte oriental da cidade (Prainha), passando depois para pontos mais afastados, a alguns kilometros de distancia, como a estação radio-telegraphica, situada na parte elevada dos campos que ficam por traz da cidade.

Eu sempre tive a impressão de que o vento dominante L—O, quando moderado, favorecia consideravelmente essa invasão de mosquitos na cidade. Nas noites em que elle soprava com mais intensidade poucas Mansonias appareciam. Só mais tarde, quando se o sentia como uma brisa, é que começava a invasão tardia desses mosquitos.

Rarissimas foram as vezes que capturei machos de *Mansonia* em minha casa, embora esta se achasse na Prainha e a pouco mais de um kilometro dos fócos.

De *M. amazonensis* logrei apanhar alguns machos, porem de *M. pseudotitillans*, apenas capturei um só exemplar macho, em cerca de meio anno de estadia em Santarem, embora ahi fosse uma especie commum, pelas muitas femeas que appareciam.

O referido exemplar, remettido para o Instituto Oswaldo Cruz com outros mosquitos, infelizmente se perdeu.

Ficou assim, até agora, desconhecido o macho de *Mansonia* (*Mansonia*) *pseudotitillans*.

Ha pouco tempo o meu discipulo LINNEU GONÇALVES, do curso de engenheiros agronomos da Escola Superior de Agricultura, apanhou á noite e dentro de sua residencia, em Jacarépaguá, um bello especimen macho desta especie.

Pude assim comparal-o com o macho da especie mais proxima (*M. titillans*), aliás bem figurado por GÖLDI em seu trabalho "Os mosquitos do Pará" (1905) e examinar-lhe a genitalia, ainda não descripta.

O aspecto geral do mosquito é semelhante ao da femea. As antennas e palpos são até certo ponto semelhantes a esses mesmos orgãos em *M. titillans*. Algumas differenças notaveis se observam nas pernas das duas especies. Assim, em *titillans*, todos os articulos tarsaes, em todas as pernas, apresentam um annel branco basal. Em *pseudotitillans* só se observa este aspecto nas pernas do par posterior. As do par medio só apresentam anneis brancos na base do 2º, 3º e do 4º; nem o 1º nem o 5º são annellados. As do par anterior apresentam 2 anneis bem visiveis, um na base do 2º e outro na base do 3º. Ha tambem um annel branco pouco visivel na base do 1º.

Em *pseudotitillans* as escamas amarelladas ou douradas, que ornam o bordo posterior dos urotergitos, formam, nos 4 primeiros, placas triangulares, mais notaveis no 2º e 3º urotergitos. Não ha, como em *titillans*, escamas amarelladas ao longo dos bordos lateraes. O 8º urotergito apresenta uma faixa longitudinal e mediana de escamas brancas, que tambem revestem o bordo posterior desse tergito.

As azas, como as da femea, são absolutamente caracteristicas. Nellas quasi que só se encontram as typicas escamas largas e asymetricas (em estandarte), emquanto que em *titillans*, ha tambem nas nervuras muitas escamas lateraes obovaes alongadas, semelhantes as que se encontram em *Rhynchotaenia*.

Alem dessas differenças ha as que se observam para o lado da terminalia (genitalia). Basta comparar a forma peculiar da pinça ("clasper") em *pseudotitillans* (v. figs. 2 e 4) com o aspecto relativamente simples desse mesmo orgão em *titillans* (v. fig. 1), para se ver como as 2 especies são inteiramente diversas. De facto, em *titillans*, a pinça, um tanto dilatada na base, apresenta lateralmente uma saliencia em forma de largo dente e termina em ramo relativamente fino com um dente apical.

A terminalia de *M. amazonensis*, como se pode ver na photomicrographia nº. 3, tambem differe muito, não só de *M. titillans*, como de *pseudotitillans*. Nella ha a assignalar os seguintes aspectos interessantes: a pinça, fortemente dilatada na base, como em *pseudotitillans*, divide-se depois em 2 peças, uma bem chitinizada no apice e ahi ligeiramente bifida e outra sob a forma de uma lamina de apice arredondado. O lobulo apical é distinctamente dividido em 2 partes: uma interna, provida de cerdas relativamente curtas, e outra externa, bem saliente, na qual se implantam cerca de 12 foliolos estreitos e alongados, alguns dos quaes mais alargados, apparentemente espatulados. O lobulo basal é representado por uma peça fortemente chitinisada e alargada que se implanta quasi perpendicularmente na peça lateral, apresentando uma face posterior plana e uma anterior convexa. No apice ha um espinho curto. As longas cerdas, que se inserem na face ventral da porção basilar da peça lateral, tem os póros de inserção contiguos (em *titillans* e em *pseudotitillans* elles são bem mais afastados) e se apresentam bem laminadas e distinctamente estriadas na porção distal. No 8º urosternito ha cerca de 10 cerdas de apice pectinado (em *titillans* e *pseudotitillans* ha cerca de 5 ou 6).

Das 3 especies citadas apenas se conhece a biologia de *M. titillans*, pela primeira vez estudada na Guyana Ingleza por MOORE (2), cujas observações se acham transcriptas na monographia de HOWARD, DYAR e KANAB, vol. III, pt. 1. p. 519.

A proposito das larvas de *Mansonia* escrevi ha tempos o seguinte:

"As larvas de *Mansonia* apresentam na extremidade do sifão 2 pequenos ganchos moveis, que podem ser introduzidos nas partes submersas de plantas aquaticas; uma vez fixado o sifão, a larva aspira o ar dos canaliculos aeriferos, muito desenvolvidos nestas plantas.

As larvas de *Mansonia titillans* (WALKER) BLANCHARD e de *Mansonia fasciolata* (LYNCH ARRIBALZAGA) DYAR & KNAB, foram descobertas por LUTZ, em aguas contendo plantas fluctuantes, ha já muitos annos.

Ele notou que elas, na agua limpa de vejetação, morreram quando não suportadas perto da superficie. Obteve a metamorfose sustentando as larvas por meio de algodão hidrofilo, formando uma camada pouco abaixo da superficie. Mais tarde, foi observado por H. W. B. MOORE, na Guiana Ingleza, o habito que tem as larvas de *Mansonia titillans* de fixar-se principalmente na *Pistia stratiotes*.

---

(2) MOORE, H. W. B. 1910. The Daily Argosy, Demerara, Jan. 27 e Fev. 3. (não consultado).

Por experiencias feitas ultimamente, verificámos, LUTZ e eu, que a larva de *Mansonia titillans* não se pode manter exclusivamente á custa do ar dissolvido n'agua. Convem notar que os foliolos branquiaes desta larva apresentam uma ramificação traqueal muito reduzida.

Prendendo larvas de *Mansonia titillans* no cilindro de vidro do meu dispositivo (Fig. 3), verificámos que morrem no fim de poucas horas.

Introduzindo no mesmo tubo alguns exemplares de *Pistia stratiotes*, com larvas de *Mansonia*, elas ficam presas ás folhas e ás raizes e assim se mantem vivas durante 3 a 4 dias" (3).

Alem da *Pistia stratiotes*, têm sido assignaladas outras plantas aquaticas fluctuantes em cujas raizes se fixam as larvas de *titillans*: *Eichhornia*, *Pontederia*, etc.

PERYASSU e QUEIROZ LIMA (Dept. Saúde Publ., Bol. Sanit., Rio de Janeiro (1923), 2, 1, p. 29) publicaram a photographia da larva e da pupa de *M. titillans*, presas á raizes de *Eichhornia* e no trabalho de BOYD (4) ha tambem uma photographia de larvas de *Mansonia titillans* fixadas a raizes de plantas da familia das *Hydrocharitaceae*.

LUTZ encontrou ulteriormente ovos de *Mansonia titillans* em folhas de *Pistia*, no Rio de Janeiro. As larvas que sairam desses ovos foram por elle criadas no laboratorio, até obter as formas adultas, mantendo-as presas á raizes de plantas do genero *Myriophyllum*. No seu trabalho sobre insectos da Venezuela (5), elle apresenta a figura de um desses ovos.

Em uma nota, que tenciono publicar brevemente, apresentarei o resultado de pesquizas que estou fazendo, no sentido de elucidar a questão relativa a validez dos nomes que têm sido dados aos mosquitos deste grupo.

---

(3) COSTA LIMA, A. da. Contribuição para o estudo da biolojia das culicidas Observações sobre a respiração nas larvas, 1916, Mem. Inst. Osw. Cruz, 8, 1, p. 40.

(4) BOYD, M. F. Studies of the epidemiology of Malaria, etc. Amer. Jour. Hyg., 1926, Monograph. Ser., 5. p. 55.

(5) LUTZ, A. Estudios de Zoologia y Parasitologia Venezoelanas, 1928, Rio de Janeiro Diciembre. Estampa 3, fig. 2.

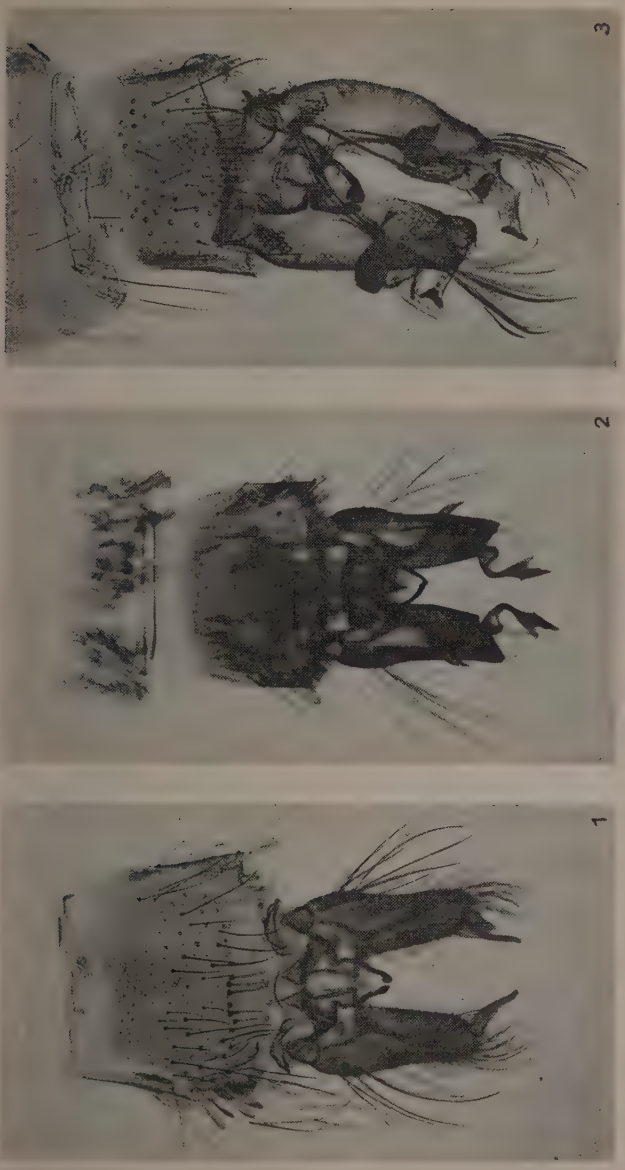


Fig. 1 *Mansonia titillans.* Terminalia.
Fig. 2—*Mansonia pseudotitulians.* »
Fig. 3—*Mansonia amazonensis.* »

Fig. 4—Parte da peça lateral e "clasper" da terminalia de *M. pseudotitillans*. Em cima, cerdas do 8º urosternito.

Fig. 5—Perfil schematico de uma *Mansonia* em repouso.

Über das Vorkommen einer in den kryptorchiden Männchen zirkulierenden Substanz mit Wirkung auf den Oestrus

Von THALES MARTINS, Dr. Med.

Aus dem physiologischen Laboratorium des Oswaldo Cruz Instituts

Im Verlauf unserer Versuche über Parabiose stellten wir weitere Beobachtungen an, indem wir weibliche normale Ratten mit kryptorchiden Männchen vereinigten.

Wie bekannt, kann die Parabiose zur Erforschung der Hormone des Hypophysen-Vorderlappens herangezogen werden; ein normales, mit einem kastrierten vereinigtes Weibchen zeigt typische Veränderungen der Eierstöcke infolge von Übergang von aus der kastrierten Partnerin stammenden hypophysären Hormonen (FELS, KALLAS, MARTINS; siehe unsere früheren Angaben).

Die Hypophyse kryptorchider Männchen erweist sich, wenn sie implantiert wird, reicher an Hormonen als die von normalen Männchen stammende (EVANS and SIMPSON).

Es könnte dies eine Anhäufung von Sekretion bedeuten oder eine Hypersekretion der Drüse darstellen.

Bei unseren Versuchen haben wir den Kryptorchismus auf chirurgischen Wege hergestellt, indem vir die Hoden in die Bauchhöhle zurückschoben und den Leistenring verschlossen.

Die Parabiose wurde mittels des Verfahrens der Kölio-anastomose ausgeführt.

VERSUCHEN

1. Versuch. Wir benutzten dazu eine weibliche Maus, deren Oestrische Zyklen wänrend eines Monats beobachtet wurden; jeder Zyklus dauerte mit grosser Regelmässigkeit 5 Tage; in einem Tage, im äussersten Falle in zwei, erschien reines Schollenstadium.

Der Kryptorchismus wurde chirurgisch bei dem Männchen 27 Tage vor der beabsichtigten Parabiose ausgeführt. Nach der Vereinigung der beiden Tiere wurde folgendes inbezug auf den Ausstrich Test beobachtet: am 3. Tage nach der Operation begannen die keratinisierten Zellen aufzutreten; am 4., 5. und 6. Tage reine Schollen; am 7. erschienen wiederum die Leukozyten, indessen waren die Schollenzellen noch in grosser Menge vorhanden.

Von da ab, Dioestrus bis zum 11. Tage, worauf 4 Tage lang reine Schollen angetroffen wurden.

Vom 15. bis zum 26. Tage waren die Leukozyten immer im Vaginalschleim festzustellen, während die Schollenzellen nicht ständig vorhanden waren.

Am 26. Tage wurden die Tiere getötet.

Es fand sich keine Uterus Hypertrophie, auch die Ovarien zeigten keine gegenüber dem Kontroll—Weibchen bemerkenswerten Unterschiede. Die Genitalorgane des männlichen Partners unterschieden sich in nichts von denen des kryptorchiden Kontroll—Tieres.

2. Versuch. Vereinigung eines normalen Rattenweibchens mit einem kryptorchiden Männchen des gleichen Wurfes.

Die Parabiose wurde 15 Tage, nachdem der künstliche Kryptorchismus hergestellt war, ausgeführt. Die Tiere waren zu dieser Zeit 8 Wochen alt.

In den ersten Tagen nach der Parabiose stieg ein Testikel des maennlichen Partners in den Hodensack herab, vielleicht infolge vermehrten Bauchdruck; vom 15. Tage ab jedoch verblieb er in der Bauchhöhle.

Bezüglich des Oestrus beim Weibchen, wurde in den ersten 22 Tagen 2 mal reines Schollenstadium beobachtet mit einer ein— bis zweitägigen Dauer.

Vom 23. bis 56. Tage wurde ausnahmslos der Scheidenabstrich ausschliesslich aus Schollenzellen bestehend vorgefunden, also ein Daueroestrus während 34 aufeinander folgenden Tagen.

Die Tiere wurden am 58. Tage getötet.

Der Uterus erwies sich angeschwollen, jedoch nicht hypertrophiert, noch durch Sekretion ausgedehnt. Die Eierstöcke waren im Vergleich zu den Kontroll—Tieren nicht vergrössert. Jedoch wurde eine grössere Anzahl von reifen Follikeln angetroffen und Mangel an Gelbkörpern. Ferner nichts Erwähnenswertes bezüglich der Geschlechtsorgane des Männlichen Partners.

3. Versuch. Parabiose einer 137 Gramm schweren weiblichen Ratte mit einem Kryptorchiden 125 Gramm wiegenden Männchen. Der Kryptorchismus wurde 28 Tage vor der Parabiose ausgeführt. Der Oestrische Zyklus des Weibchens wurde 56 Tage lang vor der Operation beobachtet. Die Gesammtdauer eines Zyklus war 4 bis 6 Tage, mit einem einen bis zwei Tage währenden reinen Schollenstadium; nur ein einziges Mal wurde ein 3 Tage dauerndes Volloestrus — Stadium festgestellt.

Am dem der Parabiose folgenden Tage fanden sich im Scheidenabstrich nur Schollenzellen. Die Gegenwart von reinen Schollen waehrte bis zum 10. Tage: man kann also von einer Verlaengerung des Oestrus sprechen.

BESPRECHUNG.

Die Versuche zeigten deutliche, dass der Oestrische Zyklus von weiblichen mit kryptorchiden Männchen vereinigten Ratten und Mäusen sich im Sinne einer Verlängerung der Volloestrus— Stadien verändert.

Dies findet nicht statt, wenn man ein Weibchen mit einem normalen Männchen parabiotisch vereinigt; im letzteren Falle veraendert sich der weibliche Zyklus entweder nicht, oder, was häufiger vorkommt, die Veraenderungen werden im Sinne einer Hemmung oder Verminderung des Oestrus offenbar. (ZACHERL, FELS, MARTINS).

Es dürfte also in der Zirkulation des kryptorchiden Tieres eine Substanz kreisen, die imstande wäre, mittel — oder unmittelbar den Oestrus zu beeinflussen.

Besonders im 2. Versuch, bei dem wir *34 Tage nacheinander Volloestrus beobachteten*, kann diese Beeinflussung nicht verschwiegen werden.

Man muss dabei ab initio, an die Hormone des Hypophysen—Vorderlappens denken.

Als direkte Ursache des Vorhandenseins derselben in grösserer Menge im Kreislauf der kryptorchiden Tiere hätten wir die Veränderungen des Hodens im fraglichen Falle in Betracht zu ziehen, nämlich die Atrophie der Samenelemente. Dies würde eine Beziehung dieser Elemente zum Hypophysen - Vorderlappen nach sich ziehen; oder die Samenelemente wären normal eines der Erfolgsorgane der prähypophysären Hormone, in der Weise, dass diese Hormone im Blute sich anhäuften; oder, im Falle des Fehlens der Samenelemente, der Vorderlappen würde dann in einen Zustand der Hyperfunktion eintreten.

Augenblicklich ist es wohl nicht möglich zu entscheiden, ob eine dieser Hypothesen Wirklichkeitswert besitzt.

Es scheint ein Unterschied zu bestehen zwischen den Wirkungen der prähypophysären, im Kreislauf kastrierter Tiere angetroffener Hormone und den oben bei den kryptorchiden Tieren beschriebenen. Es wird nicht die gleiche ausgeprägte Luteinisation beobachtet.

Wir sind zur Zeit mit Versuchen von Parabiose von normalen Weibchen mit vasoligierten Männchen beschäftigt. Da die Veränderungen an Hoden nach Vasoligatur denen des Kryptorchismus sehr ähneln, ist zu erwarten, dass in beiden Fällen die oben beschriebenen Tatsachen sich in der gleichen Weise vollziehen. Auf diese Weise wäre eine neue Erklärung der Steinach'schen Operation in den Bereich der Möglichkeit gerueckt.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

4/F